

Identifizierung differenzierungsrelevanter zellulärer Gene, deren Expression durch HPV16E6 beeinflusst wird

Dissertation

**zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)**

**vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von

Dipl.-Biologin Uta Schurig

geb. am 30.7. 1971 in Torgau

Gutachter:

Prof. Dr. Matthias Dürst (Frauenklinik der FSU
Jena)

Prof. Dr. Frank Große (IBM Jena)

Prof. Dr. Lutz Gissmann (DKFZ Heidelberg)

Tag der öffentlichen Verteidigung: 06.05.2002

INHALTSVERZEICHNIS

0 Zusammenfassung	1
1 Einleitung.....	2
1.1 Das Zervixkarzinom.....	2
1.2 HPV und die Zervixkarzinogenese	2
1.2.1 Humane Papillomaviren (HPV)	2
1.2.1.1 Aufbau der Papillomaviren.....	2
1.2.1.2 Papillomavirustypen	3
1.2.2 HPV- assoziierte Neoplasien des unteren Genitaltraktes.....	4
1.2.3 Verlauf der HPV-Infektion	5
1.3 Zellkultursysteme zum Studium der HPV - Genetik.....	6
1.4 Die HPV-Wirt-Interaktion.....	8
1.4.1 Die Proteine der Papillomaviren	8
1.4.2 Das HPV-Onkoprotein E6	10
1.4.2.1 Eukaryotische Genexpression, Transkriptionsfaktoren und Zinkfingermotiv	10
1.4.2.2 Expression und Struktur des viralen Onkoproteins HPV16E6	10
1.4.2.3 Wechselwirkungen von E6 mit zellulären Faktoren der Wirtszelle	13
1.4.3 Die Inhibition der Differenzierung primärer Keratinozyten durch HPV16E6... 14	
1.4.3.1 Die Differenzierung von Keratinozyten	14
1.4.3.2 Differentielle Expression der HPV-Gene in Abhängigkeit von der Gewebsdifferenzierung.....	15
1.4.3.3 Experimenteller Nachweis der Differenzierungsinhibition durch Sherman und Schlegel (1996)	16
1.5 Zielsetzung und experimentelles Design.....	19
2 Material und Methoden.....	20
2.1 Chemikalien und Geräte.....	20
2.2 RNA-Präparationen	21
2.2.1 Die modifizierte Wiederholung der Experimente von Sherman und Schlegel (1996).....	21
2.2.2 Die RNA-Extraktion nach der GTC-Methode (Chomczynski und Sacchi 1987)	24
2.2.3 Zusammenstellung der verwendeten RNA-Extraktionen.....	24
2.3 Differential Display of mRNA.....	25
2.3.1 Das Prinzip des „Differential Display of mRNA“	25
2.3.2 Praktische Durchführung des „Differential Display of mRNA“.....	27

2.3.2.1 DNase-Verdau	27
2.3.2.2 Die RT-PCR des „Differential Display of mRNA“	28
2.3.2.2.1 Reverse Transkription	28
2.3.2.2.2 PCR.....	29
2.3.2.3 Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte, denaturierende PAA-Gele.....	30
2.3.2.4 Ausschneiden der interessanten cDNA-Banden	31
2.3.2.5 Reamplifikation der cDNAs	31
2.3.2.6 Aufreinigung des PCR Produktes mit „QIAquick™ Gel Extraction Kit“ ...	32
2.3.2.7 Klonierung der mit dem „Differential Display of mRNA“ identifizierten cDNAs.....	32
2.3.2.8 Heterogenitätsanalyse der klonierten „Differential Display of mRNA“-cDNAs.....	32
2.3.2.8.1 Allgemeines zur Heterogenitätsanalyse	32
2.3.2.8.2 Konventionelle Isolierung von Plasmid-DNA im Minimaßstab (Minipräp)	33
2.3.2.8.3 Der Eco-R1-Verdau innerhalb der Heterogenitätsanalyse.....	33
2.3.2.8.4 Southern-Blot.....	34
2.3.2.8.5 Hybridisierung	34
2.3.2.8.6 Stammhaltung-Glyzerinkulturen	35
2.4 Detektion differentiell exprimierter Gene mit ATLAS™-cDNA Arrays.....	36
2.4.1 Die cDNA-Array-Technologie.....	36
2.4.2 Die praktische Durchführung der ATLAS™-cDNA-Array-Hybridisierung.....	36
2.4.3 Optische Auswertung der ATLAS™-Array-Hybridisierung	36
2.4.4 Auswertung der Expressionsmuster mit der Clontech-Software ATLASImage™ 1.0.....	36
2.4.5 Klonierung der interessanten cDNAs des ATLAS™-Filters in Vektoren	37
2.4.5.1 Allgemeines zur Klonierung der ATLAS™-cDNAs	37
2.4.5.2 RT-PCR für die Klonierung der ATLAS™-cDNAs.....	37
2.4.5.2.1 Reverse Transkription	37
2.4.5.2.2 PCR.....	38
2.5 Die primäre Verifikation durch Reverse-Northern-Blot-Hybridisierung	42
2.5.1 Forderungen an die Verifikation der differentiellen Genexpression	42
2.5.2 Die praktische Durchführung des Reversen-Northern-Blots.....	42
2.5.2.1 Die Plasmid-Isolation mit dem QIAGEN Minipräp-System.....	42
2.5.2.2 Herstellung der cDNA-Dot-Blots.....	42

2.5.2.3 Markierung der Hybridisierungsproben	44
2.5.2.4 Hybridisierung der Nylonfilter	44
2.5.2.5 Autoradiografie der Dot-Blots	45
2.5.2.6 Auswertung der Dot-Blot-Filter mit dem Phosphorimager	45
2.6 Die Sequenzierung der als HPV16E6-reguliert identifizierten cDNA-Klone	45
2.7 Die sekundäre Verifikation durch Northern-Blot-Hybridisierungen.....	45
2.7.1 Die elektrophoretische Auftrennung der RNA im Agarose-Gel	45
2.7.2 Northern-Blot	48
2.7.3 Hybridisierung von Northern-Blots	49
2.7.3.1 Radioaktive Markierung von DNA	49
2.7.3.2 Hybridisierungslösungen und -bedingungen	49
2.7.3.3 Exposition der hybridisierten Northern-Blots	50
3 Ergebnisse.....	51
3.1 Nachweis der durch HPV16E6 bedingten differentiellen Genexpression auf transkriptioneller Ebene durch das „Differential Display of mRNA“	51
3.1.1 Vergleich der Genexpressionsmuster zwischen HPV16E6- und LXS- transduzierten humanen primären Keratinozyten	51
3.1.2 Zusammenstellung der Expressionsmuster differentiell exprimierter cDNAs ...	55
3.1.3 Die Klonierung der mit „Differential Display of mRNA“ detektierten cDNAs	58
3.2 Nachweis der HPV16E6-bedingten differentiellen Genexpression mit ATLAS™- cDNA-Arrays	59
3.2.1 Die optische Auswertung der ATLAS™-cDNA-Arrays	59
3.2.2 Die densitometrische Auswertung der ATLAS™-cDNA-Arrays	62
3.2.3 Die Klonierung der ATLAS™-cDNAs	63
3.3 Primäre Verifikation der differentiellen Genexpression mit Reversen-Northern-Blots	65
3.3.1 HPV16E6-regulierte cDNAs als Positivkontrollen	65
3.3.2 Identifizierung der weiter bearbeiteten „Differential Display of mRNA“-cDNA- Klone.....	67
3.4 Sekundäre Verifikation der differentiellen Genexpression mit Hilfe konventioneller Northern-Blot-Hybridisierung.....	71
3.4.1 Northern-Blot-Hybridisierung ausgewählter „Differential of mRNA“-Klone ...	71
3.4.1.1 Northern-Blot-Hybridisierungs-Ergebnisse ausgewählter “Differential Display of mRNA“-Klone nukleär kodierter Gene	72
3.4.1.2 Northern-Blot-Hybridisierungs-Ergebnisse ausgewählter “Differential Display of mRNA-Klone” mitochondrial kodierter Gene	73

3.4.2 Verifikation der ATLAS TM -Array Ergebnisse mittels konventioneller Northern-Blots.....	78
3.5 Sekundäre densitometrische Auswertung der ATLAS TM -Filter LXS ^N und HPV16E6 für die 4. und 5. Infektion.....	84
3.6 Zusammenfassung der Ergebnisse.....	85
4 Diskussion	86
4.1 Vergleich der Ergebnisse mit den Arbeiten anderer Arbeitsgruppen.....	86
4.2 Die beobachteten Expressionsmuster der differentiell regulierten Klone - Konsistenz und Inkonsistenz	90
4.3 Charakterisierung der als HPV16E6-reguliert identifizierten Klone.....	93
4.3.1 Apoptose.....	93
4.3.2 Antiapoptotische virale Strategien	95
4.3.3 Terminale Keratinozytendifferenzierung <i>in vivo</i> und Apoptose.....	96
4.3.4 Allgemeine Einordnung der identifizierten Klone ins apoptotische Geschehen	97
5 Literaturverzeichnis.....	108
6 ANHANG.....	I
6.1 Sequenzen der mit “Differential Display of mRNA” identifizierten Klone.....	I
6.2 Tabellen und Abbildungen.....	XXI
6.3 Lebenslauf.....	XXXII
6.4 Selbständigkeitserklärung	XXXIII
6.5 Ehrenwörtliche Erklärung.....	XXXIV

Abkürzungen

μCi.....	Mikro-Curie
μg.....	Mikrogramm
μl.....	Mikroliter
μM.....	Mikromolar
°C.....	Grad Celcius
Abb.....	Abbildung
ADP.....	Adenosindiphosphat
AHV.....	Alcelaphines Herpesvirus
APS.....	Ammoniumpersulfat
AS.....	Aminosäure
ATP.....	Adenosintriphosphat
ATPase.....	Adenosintriphosphatase
BHV.....	Bovines Herpesvirus
bp.....	Basenpaare
BPV.....	Bovines Papillomavirus
BSA.....	Bovines Serum-Albumin
Ca ²⁺	Kalzium-Ion
CD.....	engl. cluster of differentiation
cDNA.....	Komplementäre DNA (engl. complementary DNA)
CIN.....	Zervikale Intraepitheliale Neoplasie (engl. cervical intraepithelial neoplasia)
cm.....	Zentimeter
cm ²	Quadratcentimeter
C-Terminus.....	Carboxy-Terminus
Cys.....	Cystein
dATP.....	Desoxy-Adenosintriphosphat
dCTP.....	Desoxy-Cytidintriphosphat
DD.....	engl. differential display of mRNA
DEPC.....	engl. diethylpyrocarbonate
dest.....	destilliert
dGTP.....	Desoxy-Guanosintriphosphat
DKFZ.....	Deutsches Krebsforschungszentrum
DNA.....	Desoxyribonukleinsäure (engl. desoxyribonucleic acid)
DNase.....	Desoxyribonuklease
dNTP.....	Desoxy-Nukleotidtriphosphat
DTT.....	Dithiotreitol
dTTP.....	Desoxy-Thymidintriphosphat
E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7...	Frühe Proteine der Papillomaviren (engl. early proteins)
E6I, E6II, E6III.....	Spleißingvarianten des frühen HPV-Proteins E6
EBV.....	Epstein-Barr-Virus
EDTA.....	Ethylendiamintetraacetat
EGF.....	engl. epidermal growth factor
EHV.....	Equines Herpesvirus
ESTs.....	engl. expressed sequenced tags
FACS.....	engl. fluorescence-activated cell sorting
FCS.....	Fötales Rinderserum-Albumin (engl. fetal calf serum)
g.....	Gramm
GTC.....	Guanidiniumisothiocyanat
HCMV.....	Humanes Cytomegavirus
HPK1A.....	Humane Keratinozytenzelllinie 1A (human primary

	keratinocytes 1A)
HPV.....	Humanes Papillomavirus
HR-HPV-Typen.....	Hoch-Risiko-HPV-Typ (engl. high risk HPV-type)
HVS.....	Herpesvirus saimiri
IFN.....	Interferon
IFN- β	Intereferon beta
IL-1.....	Interleukin 1
IRF.....	Interferon-regulatorischer Faktor
K.....	Klon
kb.....	Kilobasen
kbp.....	Kilobasenpaare
kDa.....	Kilodalton
kJ.....	Kilojoule
KSFM.....	Serumfreies Keratinozytenmedium (engl.= keratinocyte serum free medium)
l.....	Liter
L1, L2.....	Späte Proteine der Papillomaviren (engl. late)
LCR.....	Lange kodierende Region (engl. long coding region)
LR-HPV-Typen.....	Niedrig-Risiko-HPV-Typ (engl. low-risk-HPV-type)
LXSN.....	Bezeichnung des benutzten retroviralen Vektors
M.....	molar
MCV.....	Molluscum contagiosum Virus
mg.....	Milligramm
min.....	Minute
ml.....	Milliliter
mm.....	Millimeter
mM.....	Millimolar
mRNA.....	Boten-RNA (engl. messenger RNA)
N.....	Normal
ng.....	Nanogramm
NGF.....	engl. nerve growth factor
nm.....	Nanometer
PAA-Gel.....	Polyacrylamidgel
PCR.....	Polymerasekettenreaktion (engl. polymerase chain reaction)
RNA.....	Ribonukleinsäure (engl. ribonucleic acid)
rpm.....	Umdrehungen je Minute (engl. rotations per minute)
rRNA.....	ribosomale RNA
RT.....	Reverse Transkription
s.....	Sekunde
SDS.....	Sodiumdodecylsulfat (Natriumdodecylsulfat)
β -Aktin.....	beta-Aktin
SV40.....	Simian Virus 40
Tab.....	Tabelle
TNF.....	Tumornekrosefaktor
TNF-R.....	Tumornekrosefaktorrezeptor
tRNA.....	Transfer-RNA
U/ μ l.....	Units je Mikroliter
UV.....	Ultraviolett
V.....	Volt

0 Zusammenfassung

Humane Papillomaviren sind an der Entstehung des Zervixkarzinoms beteiligt. Die Charakterisierung der viralen Genprodukte stellt einen wichtigen Weg dar, die Entstehung des Zervixkarzinoms zu verstehen. HPV16 gehört im Zusammenhang mit der Zervixkarzinogenese zu den Hoch-Risiko-HPV-Typen. Tumoren sind u.a. durch fehlende Differenzierung der Zellen gekennzeichnet. Durch Transfektion des viralen Onkoproteins HPV16E6 in humane primäre Keratinozyten kam es nach Zugabe der Differenzierungsfaktoren Kalzium und Serum zur Ausbildung differenzierungsresistenter Keratinozyten-Kolonien (Sherman und Schlegel 1996).

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war es, genetische Veränderungen auf transkriptioneller Ebene zu ermitteln, die dieser Differenzierungsresistenz zu Grunde liegen. Dafür wurden die Experimente von Sherman und Schlegel modifiziert wiederholt. Nach Transduktion humaner primärer Keratinozyten mit dem viralen Onkogen HPV16E6 und dem Leervektor LXS_N wurde RNA aus den Zellpopulationen extrahiert. Zur Untersuchung der Transkription wurde primär das auf RT-PCR beruhende Verfahren des „Differential Display of mRNA“ eingesetzt. Die Untersuchungen wurden im Laufe der Arbeit mit der cDNA-Array-Technologie erweitert.

Den kritischsten Punkt der gesamten Untersuchungen stellten die limitierten RNA-Mengen für die Verifikation der differentiellen Genexpression dar. Für jede Probe standen zwischen 50-100 µg RNA zur Verfügung. Aus diesem Grund wurde innerhalb dieser Arbeit ein Reverses-Northern-Blot-Protokoll in Kombination mit einer vorgeschalteten Klonheterogenitäts-Analyse für die primäre Verifikation etabliert. Die sekundäre Verifikation wurde, soweit möglich, mit der konventionellen Northern-Blot-Technik durchgeführt.

Mit Hilfe des „Differential Display of mRNA“ konnten insgesamt 53 cDNAs identifiziert werden, die durch Transduktion des HPV16E6-Volllängen-Onkoproteins in humane primäre Keratinozyten differentiell exprimiert wurden. 36 davon konnten bekannten zellulären Genen zugeordnet werden. 17 stellen unbekannte bzw. nicht funktionell charakterisierte ESTs dar. Erstmals konnte gezeigt werden, dass durch HPV16E6 die Transkription mitochondrial kodierter Gene verändert wird. Mit Hilfe der mit den ATLASTM-cDNA-Arrays durchgeführten Expressionsanalysen konnten zusätzlich 22 durch HPV16E6 verändert exprimierte Gene ermittelt werden.

Die HPV16E6-regulierten Gene konnten mit der Apoptose, der Karzinogenese und der Keratinozytendifferenzierung in Zusammenhang gebracht werden. Es kann davon ausgegangen werden, dass sie bei der antiapoptotischen Wirkungsweise des HPV16E6-Proteins eine Rolle spielen und zum größten Teil für die Differenzierungsresistenz verantwortlich sind.

Durch weiterführende, sich an diese Arbeit anschließende Experimente soll gezeigt werden, ob die identifizierten HPV16E6-regulierten Gene auch in natürlich entstandenen Läsionen (Präkanzerosen und Karzinomen) verändert exprimiert vorliegen. Eine Korrelation unterschiedlicher Expressionsprofile mit den Progressionsstadien ist denkbar.

1 Einleitung

1.1 Das Zervixkarzinom

Der Gebärmutterhalskrebs (das Zervixkarzinom) ist eine der häufigsten gynäkologischen Krebsarten. Weltweit werden pro Jahr rund 471 000 Neuerkrankungen an Gebärmutterhalskrebs und ca. 215 000 Todesfälle registriert (Fischer *et al.* 2001). Allein in Deutschland gab es 1997 rund 5 800 Neuerkrankungen (Fischer *et al.* 2001).

Schon vor über 100 Jahren wurden in verschiedenen experimentellen Untersuchungen Hinweise für eine infektiöse Ursache von Tumorerkrankungen gesammelt. Für das Zervixkarzinom wurde der Zusammenhang zwischen einer HPV-Infektion und der Karzinogenese in den 70er-Jahren erstmals postuliert (zur Hausen 1976 und 1977). Dieser Zusammenhang bestätigte sich, als Anfang der 80er-Jahre die ersten zwei damals noch unbekannten HPV-DNA-Isolate aus Zervixkarzinombiopsiematerial kloniert werden konnten (Dürst *et al.* 1983, Boshart *et al.* 1984).

In ca. 100 Fallkontrollstudien in den 80er- und 90er-Jahren wurde eine enge Korrelation zwischen dem Nachweis von HPV16-DNA und dem Vorkommen von invasivem Zervixkarzinom und dessen Vorstufen gezeigt (IARC Monograph 1995). Heute ist es nahezu unumstritten, dass die maligne Transformation der Zellen des Ano-Genitaltraktes eng mit einer HPV-Infektion assoziiert ist. Da diese Infektion vorwiegend sexuell übertragen wird (Schneider *et al.* 1999) und die Ansteckungswahrscheinlichkeit mit der Anzahl der Sexualpartner zunimmt, wird sie durch das in den letzten Jahrzehnten veränderte Sexualverhalten zunehmend zum Gesundheitsrisiko bei jüngeren Frauen.

1.2 HPV und die Zervixkarzinogenese

1.2.1 Humane Papillomaviren (HPV)

1.2.1.1 Aufbau der Papillomaviren

Humane Papillomaviren sind kleine, nicht von Membranen umgebene DNA-Viren. Sie gehören zur Familie der Papillomaviridae (van Regenmortel *et al.* 2000). Der Durchmesser der HPV-Kapside beträgt 55 nm. Die ikosaedrischen Kapside bestehen aus 72 Kapsomeren, die von zwei Strukturproteinen (L1 und L2) gebildet werden. Das Strukturprotein L1 ist das abundantere Kapsidprotein und bildet rund 80 % des Gesamtproteins des Viruspartikels. Im Inneren des Viruskapsids befindet sich das virale Genom mit einer Größe von ungefähr 8 kbp. Das Virus-Genom ist doppelsträngig und zirkulär. Es liegt mit zellulären Histonproteinen in einer nukleosomenähnlichen Struktur assoziiert als Superhelix vor.

Das zirkuläre Genom der Papillomaviren kann in zwei kodierende und einen funktionellen Bereich aufgeteilt werden. Die erste Region kodiert für die früh im Vermehrungszyklus benötigten Proteine. Diese Proteine werden als frühe Proteine bezeichnet (früh = engl. **early**, **E1 - E7**). Die spät in der Virusreplikation benötigten Proteine werden als späte Proteine bezeichnet (spät = engl. **late**, **L1 und L2**). Bei ihnen handelt es sich, wie oben beschrieben, um die das Kapsid bildenden Strukturproteine L1 und L2.

Die Transkription der kodierenden Bereiche erfolgt unter Verwendung der verschiedenen offenen Leserahmen nur eines DNA-Stranges. Alle frühen und späten Funktionen werden von diesem Strang des Virusgenoms transkribiert. Zwischen dem Ende der späten und dem Beginn der frühen Region liegt ein ca. 1000 bp langer Bereich, der keine offenen Leserahmen für virale Proteine enthält. Es handelt sich dabei um eine Kontrollregion für die Transkription und Replikation der Virus-DNA. Sie wird als LCR (**LCR**= engl. **L**ong **C**ontrol **R**egion) bezeichnet, weil sie die meisten viralen cis-arbeitenden Kontrollelemente (z.B. Promotoren, Enhancer) und den Replikationsursprung enthält.

1.2.1.2 Papillomavirustypen

Die einzelnen Vertreter der Papillomaviren sind streng speziesspezifisch und epithelotrop. So können humane Papillomaviren nur menschliche Zellen epithelialen Ursprungs (humane Keratinozyten) infizieren. HPV ist die Bezeichnung der Gruppe, in der die Vertreter der Papillomaviren zusammengefasst werden, die epitheliales Gewebe vom Menschen befallen. In der Gruppe der bovinen Papillomaviren (BPV) sind alle Vertreter enthalten, die Keratinozyten von Rindern infizieren können (zum Rind gehörend = lat. bovin).

Heute sind mindestens 140 verschiedene humane Papillomavirustypen (HPV-Typen) bekannt. Ungefähr zwei Dutzend befallen die epithelialen Gewebe des Ano-Genitaltraktes (de Villiers 1994 und 1997). Bei Viren nimmt man im Allgemeinen eine Klassifizierung in Serotypen vor. Da es keine spezifischen Antikörper für die Durchführung einer serologischen Typisierung bei HPV gibt, werden die humanen Papillomaviren nicht nach dem Serotyp, sondern nach dem Genotyp klassifiziert (Stoler 2000). Man spricht von einem neuen HPV-Typ, wenn sein Genom zu mindestens 10 % von allen bekannten HPV-Typen abweicht (Stoler 2000).

Aus dieser Definition und aus computergestützten Berechnungen der Sequenzen ist es klar, dass die unterschiedlichen HPV-Typen eine längere Evolution hinter sich haben. Diese lief wahrscheinlich als Koevolution mit der des Menschen ab (van Ranst *et al.* 1992 und 1993, Ho *et al.* 1994). Die verschiedenen HPV-Typen sind folglich nicht das Produkt einer einfachen Punktmutation, sondern das Ergebnis hintereinander folgender genetischer Ereignisse. Nach der zeitlichen Abfolge ihrer Erstbeschreibung sind die HPV-Typen durchnummeriert und damit benannt worden.

Die Gruppenbildung der humanen Papillomaviren aufgrund ihrer Sequenz verläuft bemerkenswert parallel mit der Gruppierung nach ihrem Gewebstropismus in kutane und muköse Typen, die für die klinische Praxis von großer Bedeutung ist (Lorincz *et al.* 1992). Kutane HPV-Typen infizieren Keratinozyten der Haut und muköse Typen die der Schleimhaut. Die mukösen und kutanen HPV-Typen lösen unterschiedliche klinische Symptome aus.

Die mukösen HPV-Typen, die Zellen des Zervixepithels befallen, werden aufgrund ihres unterschiedlichen onkogenen Potentials zusätzlich in Hochrisiko-HPV-Typen (engl. **H**igh **R**isk

Type = **HR**-Type) und Niedrigrisiko-HPV-Typen (engl. **Low-Risk**-Type = **LR**-Type) unterteilt. Auch diese Klassifizierung ist praxisnah und spielt bei der Einschätzung des Progressionsrisikos von Dysplasien eine wesentliche Rolle. Die sogenannten HR-HPV-Typen (besonders häufig HPV16 und HPV18) sind stark mit der Entwicklung von menschlichen genitalen Krebsarten (z.B. Zervixkarzinom, Peniskarzinom) assoziiert. Die LR-HPV-Typen können nur selten in Zervixkarzinombiopsiematerial nachgewiesen werden. Die Infektion mit diesen Virustypen führt im Allgemeinen nicht zum Zervixkarzinom. Die bekanntesten Vertreter dieser Gruppe sind HPV6 und HPV11. Die viralen Gene dieser beiden LR-HPV-Typen werden häufig als experimentelle Kontrollen eingesetzt, um genetische Eigenschaften, die für HR-HPV-Typen charakteristisch sind, von denen zu unterscheiden, die allen HPV-Typen eigen sind.

1.2.2 HPV- assoziierte Neoplasien des unteren Genitaltraktes

Die überwiegend squamösen Karzinome des unteren Genitaltraktes der Frau entwickeln sich über histologisch erkennbare präinvasive Vorstufen, die allgemein als Neoplasien bezeichnet werden. Unter Neoplasie wird ein neu auftretendes und unkontrolliertes Wachstum von Zellen verstanden. Nach seiner Lokalisation wird es beim Zervixkarzinom als zervikale intraepitheliale Neoplasie (**CIN** = engl. **Cervical Intraepithelial Neoplasia**) bezeichnet. Aufgrund des Differenzierungsgrades der transformierten Zellen im Vergleich zu Zellen im gesunden Ursprungsgewebe werden die zervikalen intraepithelialen Neoplasien klassifiziert. Je nach Ausmaß des Differenzierungsverlustes der epithelialen Zellen werden sie als leichte (CIN I), mittelgradige (CIN II) und schwere Neoplasien (CIN III) bezeichnet. Diese Klassifikation nach Richard von 1973 (gem. Stegner 1997) hat die traditionelle Unterteilung der Entwicklungsstadien bei der Zervixkarzinogenese in Dysplasie (leichte, mittelgradige und schwere) und Carcinoma *in situ* abgelöst.

Auch unter einer Dysplasie versteht man im Allgemeinen ein abnormales Zellwachstum. Die Begriffe zervikale Dysplasie und zervikale intraepitheliale Neoplasie werden deshalb heute oft synonym benutzt. Ausgehend von der Erkenntnis, dass sich schwere Dysplasien und Carcinoma *in situ* nicht grundsätzlich in ihrem prämaligen Potential unterscheiden, wurden diese beiden Entwicklungsstufen des Zervixkarzinoms im Grad drei der intraepithelialen Neoplasien (CIN III) zusammengefasst.

Hauptmerkmale für leichte zervikale intraepitheliale Neoplasien (CIN I) sind mitotisch aktive Zellen in der suprabasalen Hautschicht, in der normalerweise keine Mitose mehr beobachtet werden kann, und ein etwas geringerer Differenzierungsgrad der dysplastischen Zellen im Vergleich zu gesunden Zellen des Ursprungsgewebes. Schwere Neoplasien (CIN III), die auch das Carcinoma *in situ* beinhalten, sind durch mitotisch aktive Zellen im gesamten Epithel und ein daraus resultierendes schnelles Größenwachstum sowie durch die fehlende Differenzierung des Gewebes (Anaplasie) charakterisiert. Diese Veränderungen sind atypisch, d.h. im gesunden normalen Gewebe nicht auftretend. Die letzte Progressionsstufe ist das invasive Karzinom, welches zusätzlich durch Invasion ins umliegende Gewebe und Metastasierung gekennzeichnet ist.

Jede prämaligne Neoplasie hat drei Möglichkeiten, sich im zeitlichen Verlauf zu verändern: Die Regression, d.h. die spontane Rückbildung der Neoplasie bzw. der Übergang zu einer niedrigergradigeren zervikalen intraepithelialen Neoplasie, die Persistenz, d.h. keine Veränderung der Neoplasie und die Progression, d.h. die Entwicklung zu einer höhergradigen zervikalen intraepithelialen Neoplasie. Die verschiedenen Grade der zervikalen intraepithelialen Neoplasien (CIN I – CIN III) korrelieren mit einem abgestuften Risiko der Entartung zum invasiven Karzinom. Während für schwere zervikale intraepitheliale Neoplasien (CIN III) spontane Regressionen eher die Ausnahme darstellen, zeigen leichte zervikale intraepitheliale Neoplasien (CIN I) in ca. 60 % der Fälle Spontanregressionen und weniger als 20 % progredieren zu höheren Atypiegraden (Nasiell *et al.* 1983, Carmichael und Maskens 1989, Kataja *et al.* 1989).

Die squamösen zervikalen intraepithelialen Neoplasien sind nach virologischen und morphologischen Befunden überwiegend die Konsequenz einer (vermutlich in vielen Fällen seit Jahren) persistierenden HPV-Infektion. Die Erkenntnisse über einen kausalen Zusammenhang zwischen der Infektion mit humanen Papillomaviren und der Zervixkarzinomentstehung haben neben der Einteilung der Neoplasien zu einer weiteren häufig verwendeten Klassifikation geführt. Bei dieser wird zwischen latenter, subklinischer und klinischer HPV-Infektion unterschieden. Die mikroskopisch nachweisbare subklinische Infektion gilt heute als erste Stufe in der Progressionskette bei der Entstehung des Gebärmutterhalskrebses.

1.2.3 Verlauf der HPV-Infektion

Humane Papillomaviren gelten heute als auslösendes Agens für die Entstehung des Zervixkarzinoms. Bei der molekularbiologischen Untersuchung von Biopsiematerial zeigte es sich, dass in über 90 % der Zervixkarzinome HPV-DNA-Sequenzen enthalten waren (zur Hausen 1989 und 1994). Die HPV-Typen 16 und 18 sind am häufigsten an der Zervixkarzinogenese beteiligt (zur Hausen 1994).

Der natürliche Verlauf von genitalen HPV-Infektionen ist heute zum größten Teil bekannt. Die Übertragung genitaler HPV-Typen erfolgt primär durch Sexualkontakt. Andere Möglichkeiten wie die perinatale und digitale Übertragung werden diskutiert (Schneider *et al.* 1999). Frauen mit persistierenden HPV-Infektionen haben ein hohes Risiko an Zervixkarzinom zu erkranken (zur Hausen 1991).

Der Verlauf einer HPV-Infektion von der latenten bis zur klinischen Phase, d.h. bis zur möglichen Manifestierung als Gebärmutterhalskrebs, kann in mehrere Phasen unterteilt werden. Zwischen diesen Phasen können Jahre, z.T. Jahrzehnte liegen. Der Verlauf der Zervixkarzinogenese stellt sich nach den Untersuchungen von Milde-Langosch *et al.* (1999) folgendermaßen dar:

(1) Latente HPV-Infektion: Die Infektion nach sexueller Übertragung findet zunächst im Bereich der basalen Epithelzellen statt. Kleine Schleimhautverletzungen sowie die Transformationszone zwischen Zylinder- und Plattenepithel des Gebärmutterhalses (Zervix) sind besonders anfäl-

lig. Eine Virus-DNA-Replikation findet vorerst nur in Verbindung mit der Replikation der Wirts-DNA statt und führt zu keinen morphologischen Veränderungen der infizierten Zellen. Der Nachweis der Virus-DNA ist nur über hoch sensitive molekularbiologische Techniken möglich. Während die Mehrzahl dieser Infektionen transient ist, besteht für Fälle mit persistierender HPV-Positivität in Abhängigkeit von HPV-Typ, Virusmenge und Zeit eine stark erhöhtes Risiko, an einer Dysplasie zu erkranken.

(2) Subklinische HPV-Infektion = leichte bis mittelgradige zervikale intraepitheliale Neoplasie (CIN I bzw. CIN II) = leichte bis mittelgradige Dysplasie: In den höheren Epithelschichten findet mit zunehmender Differenzierung eine erhöhte Virusreplikation statt, die zu typischen morphologischen Veränderungen (Koilozytosen u.a.) führt. Die Zahl der mit leichten Dysplasien assoziierten HPV-Typen (LR- und HR-HPV-Typen) ist hoch. Die Virus-DNA liegt stets episomal vor. Die Expression der viralen Proteine E6 und E7 in der basalen und suprabasalen Epithelschicht ist sehr schwach. Eine spontane Regression dieser Dysplasien ist häufig, insbesondere bei LR-HPV-Typ-Infektionen.

(3.1) Klinische HPV-Infektion = schwere Dysplasie (CIN III) = schwere Dysplasie und Carcinoma in situ: Diese Neoplasien sind überwiegend mit bestimmten HR-HPV-Typen (HPV 16, 18, 31, 33, 45) assoziiert. Die Virus-DNA liegt episomal und z.T. auch ins Wirtsgenom integriert vor. Die schwere Dysplasie ist stets monoklonal und häufig Telomerase-positiv. Durch *in-situ*-Hybridisierungen ist eine deutliche E6/E7-Expression in der Basalschicht nachweisbar. Durch das bereits in der subklinischen Phase beginnende Ausschalten der Tumorsuppressorproteine p53 und RB und andere Zellzyklusinhibitoren kommt es zur Akkumulation zusätzlicher genetischer Veränderungen wie z.B. Aneuploidien, Onkogenaktivierung, Allelverlusten und damit zur weiteren Progression. Eine spontane Regression wird in diesem Stadium seltener beobachtet.

(3.2) Klinische HPV-Infektion = invasives Karzinom: Die Virus-DNA liegt in ca. 2/3 der Fälle integriert vor, eine Spontanregression ist in diesen Fällen unwahrscheinlich. Die viralen Onkoproteine E6 und E7 werden sehr stark exprimiert. Die Akkumulation genetischer Veränderungen nimmt weiter zu. Die transformierten Zellen durchdringen die Basallamina und wandern in die darunter liegenden Gewebe ein.

1.3 Zellkultursysteme zum Studium der HPV - Genetik

Da es nicht möglich ist, humane Papillomaviren in Gewebekulturen zu vermehren und sie aufgrund ihrer strengen Wirtsspezifität auf Labortiere zu übertragen, ist es extrem schwierig, die Bedeutung der humanen Papillomaviren für die Zervixkarzinogenese zu untersuchen. In den 70er-Jahren wurde es möglich, mit der molekularbiologischen Charakterisierung der Papillomaviren zu beginnen. Diese führte zu vielen neuen Erkenntnissen über die Wirkungsweise von humanen Papillomaviren bei der Entstehung des Zervixkarzinoms.

Verschiedene HPV-Typen wurden in Plasmidvektoren kloniert. Die Klone dieser HPV-Genome wurden als Proben benutzt, um z.B. durch Hybridisierungsexperimente die Verbindung

zwischen zervikalen Dysplasien und HPV herzustellen. Eine aktive Transkription der HPV-DNA konnte in Biopsiematerial von Zervixkarzinomen und prämaligen Vorstufen nachgewiesen werden (Dürst *et al.* 1992, Sherman *et al.* 1992, Yee *et al.* 1985, Smotkin und Wettstein 1986). Durch die gesammelten Daten wurde gezeigt, dass es eine enge Assoziation zwischen dem Vorkommen von HPV-DNA und dem Auftreten des Zervixkarzinoms gibt.

In-vitro-Zelltransformationsexperimente bestätigten zusätzlich die Bedeutung von HPV bei der Zervixkarzinogenese. Zahlreiche eukaryotische Zellen wurden mit dem gesamten HPV-Genom transfiziert. DNA von den HR-HPV-Typen 16, 18, 31 und 33, aber interessanterweise nicht von den LR-HPV-Typen 6 und 11, konnten epitheliale Zellkulturen transformieren und immortalisieren, wenn zusätzlich noch zelluläre Protoonkogene wie Ha-ras aktiviert wurden (Land *et al.* 1993, Matlashewski *et al.* 1987 und 1988, Storey *et al.* 1988, Storey und Banks 1993). Durch alleinige Transfektion von HPV16-DNA war es möglich, kultivierte humane primäre Vorhautkeratinozyten bzw. zervikale primäre Keratinozyten zu immortalisieren (Dürst *et al.* 1987, Pirisi *et al.* 1987 und 1992, Woodworth *et al.* 1989 und 1990). Es konnte gezeigt werden, dass HPV16-DNA die Differenzierung von Keratinozytenkulturen inhibieren kann (McCance *et al.* 1988).

Deletionsexperimente wurden durchgeführt, um die essentiellen Gene für die transformierenden Eigenschaften zu identifizieren. Es wurde nachgewiesen, dass die Expression der viralen Proteine HPV16E6 und HPV16E7 ausreichend ist, um Zellen zu immortalisieren (Hawly-Nelson *et al.* 1989, Halbert *et al.* 1991, Münger *et al.* 1989). Man nahm daher an, dass diese beiden Proteine bei der Tumorentstehung und bei der Tumorsektion eine Schlüsselrolle spielen. Zahlreiche Untersuchungen der onkogenen Eigenschaften von E6 und E7 unterstützen diese Annahme. Es zeigte sich dabei auch, dass die biologischen Aktivitäten der viralen Onkoproteine E6 und E7 von den benutzten Wirtszellen abhängig sind. So war es möglich, Zellen von Nagetieren mit humaner Papillomavirus-DNA, aber auch mit HPV16E6 bzw. HPV16E7 allein zu immortalisieren (Kanda *et al.* 1988, Yasumoto *et al.* 1986). Singuläre Transfektion von HPV16E6 in Brustepithelzellen verursachte eine Immortalisierung dieser Zellen (Wazer *et al.* 1995, Band *et al.* 1991). Bei den natürlichen Wirtszellen, genitalen Keratinozyten, war der immortale Phänotyp vorerst jedoch nur durch die Transfektion des gesamten HPV16-Genoms (McCance *et al.* 1988) bzw. durch eine Kotransfektion von HPV16E6 und HPV16E7 induzierbar (Hawly-Nelson *et al.* 1989, Halbert *et al.* 1991, Münger *et al.* 1989).

Durch Transfektions- und später durch Transduktionsexperimente wurde es möglich, die Eigenschaften von E6 und E7 näher zu spezifizieren. 1991 wurde bewiesen, dass auch HPV16E7 allein ausreichend ist, humane primäre Keratinozyten, wenn auch mit deutlich geringerer Effizienz, zu immortalisieren (Halbert *et al.* 1991). E7 wurde die entscheidende Rolle für die Immortalisierung zugeschrieben.

Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass eine Kotransfektion von HPV16E6 und HPV16E7 die Serum- und Kalzium-induzierte Differenzierung von Keratinozyten verhindert (Schlegel *et al.* 1988). Durch Hudson *et al.* (1990) wurde experimentell bestätigt, dass E7 von HPV18 nur einen geringen Effekt auf die Zelldifferenzierung hat. Durch die Einführung von HPV16E6 in Kerati-

nozyten, welche durch HPV16E7 immortalisiert waren, wurde die Zellteilungsrate erhöht und die Differenzierung verändert (Lechner *et al.* 1992). Die Ergebnisse dieser Arbeiten unterstützten die Annahme, dass E6 vor allem für den zunehmenden Verlust der Differenzierungsmerkmale der epidermalen Keratinozyten während der Zervixkarzinogenese verantwortlich ist.

Heute weiß man, dass viele in Zellkultursystemen gewonnen Ergebnisse auf das natürliche Geschehen innerhalb der Zervixkarzinogenese übertragbar sind. Die künstlichen Prozesse in den Zellkultursystemen kommen mit hoher Wahrscheinlichkeit den natürlich ablaufenden HPV-induzierten Prozessen sehr nahe. So ist bei der Immortalisierung von Keratinozytenzelllinien z.B. bemerkenswert, dass in diesen Systemen der transformierte Phänotyp nicht sofort, sondern erst nach einigen Zellgenerationen zum Vorschein kommt (Dürst *et al.* 1995, Seagon und Dürst 1994). Diese Verzögerung ist mit der langen Progression bei klinischen Neoplasien vergleichbar und führt zu der Annahme, dass noch zusätzliche genetische Prozesse bei der Manifestierung der Transformation eine Rolle spielen müssen. Viele zelluläre Gene, die in Zellkultursystemen durch HPV-Gene transkriptionell und translationell dereguliert wurden, konnten auch in Biopsiematerial von Gebärmutterhalskrebsvorstufen und Karzinomen als differentiell exprimiert dargestellt werden (Nees *et al.* 1998).

1.4 Die HPV-Wirt-Interaktion

1.4.1 Die Proteine der Papillomaviren

Viren sind keine eigenständig vorkommenden Lebensformen. Sie unterscheiden sich von anderen Mikroorganismen u.a. durch die Eigenschaft, dass sie sich nur in lebenden Zellen vermehren können. Ihre Replikation und Vermehrung ist von dem Stoffwechsel der Wirtszelle abhängig. Wichtige Stoffwechselwege der Wirtszelle werden zum Vorteil des Virus verändert.

Zwei Klassen von viralen Proteinen interagieren für diesen Zweck mit der Wirtszelle. Die erste Klasse beinhaltet Proteine, die das zelluläre Wachstum beeinflussen. Ihre Aufgabe besteht darin, den Zellzyklus der Wirtszellen zu deregulieren, den Übergang von der G1-Phase in die S-Phase anzuregen und dadurch die Proliferationsrate der Wirtszellen zugunsten der Virusreplikation zu erhöhen. Die Proteine der zweiten Klasse sind für den optimalen Ablauf der viralen DNA-Replikation verantwortlich und steuern die virale Transkription.

Bei den Papillomaviren gehören die frühen HPV-Proteine (E1 - E7) zu diesen beiden Klassen. Die Proteine E5, E6 und E7 können in die erste Klasse eingeordnet werden, die für die Regulation des Zellwachstums verantwortlich ist. Die restlichen frühen HPV-Proteine (E1, E2 und E4) sind für die Regulation der Virusreplikation und der viralen Transkription verantwortlich und gehören somit zur zweiten Proteinklasse. Die Existenz von E3 ist umstritten. Im Folgenden sind die einzelnen Aktivitäten der viralen frühen HPV-Proteine beider Klassen zusammengestellt.

A) Regulatoren der Papillomavirus-DNA-Replikation

E1 ist das größte HPV-Protein (Clertant und Seif 1984, Luský und Fontane 1991). Es ist für die Replikation des viralen Genoms erforderlich. Es kodiert die einzige bekannte enzymatische

Funktion des HPV-Genoms. Dieses Protein hat eine ATPase/Helikase-Aktivität und ist für die DNA-Synthese vom Replikationsursprung notwendig (Sun *et al.* 1990, Seo *et al.* 1993).

E2 spielt sowohl in der Virusreplikation als auch in der Regulation der viralen Gentranskription eine bedeutende Rolle (McBride *et al.* 1991, Thierry 1996). Dieses HPV-Protein kann die virale Transkription durch die Bindung an die LCR-Region steuern (Alloul und Sherman 1999). Es ist außerdem mit E1 assoziiert, um die DNA-Replikation zu initiieren (Blitz und Laimins 1991, Benson und Howley 1995).

E4 wird als E1-E4-Fusionsprotein exprimiert (Chow *et al.* 1987). Obwohl als frühes Protein bezeichnet, wird es vor allem in der produktiven oder späten Phase der Infektion transkribiert und translatiert (Doorbar *et al.* 1988, Grand *et al.* 1989, Rogel-Gaillard *et al.* 1992). Es kann mit Proteinen des Zytoskeletts wechselwirken (Doorbar *et al.* 1997).

B) Regulatoren des zellulären Wachstums

E5 ist ein kleines hydrophobes Protein. Das HPV-Protein E5 hat transformierende Eigenschaften (Ostrow *et al.* 1993). Es kann unter anderem mit Wachstumsfaktorrezeptoren, z.B. dem epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor, assoziiert sein und aktiviert diese (Rodriguez *et al.* 2000).

E7 gehört zusammen mit E6 zu den beiden bedeutendsten und am besten untersuchten HPV-Proteinen. E7 erhöht im Allgemeinen die Zellteilungsrate und hat die Funktion eines Mitogens (Halbert *et al.* 1991). In ruhenden Zellen assoziiert das Retinoblastoma Protein (RB), ein Tumorsuppressorprotein der Zelle, mit dem zellulären Transkriptionsfaktor E2F und inaktiviert diesen damit (Chellapan *et al.* 1992, Nevins 1992). Wenn es nach HPV-Infektion zur Produktion des HPV-Proteins E7 kommt, bindet E7 das RB-Protein (Chellapan *et al.* 1992, Dyson *et al.* 1992). Dadurch wird die Interaktion zwischen RB und E2F aufgehoben, und E2F liegt in der freien und damit aktiven Form vor. Freies E2F verursacht die Transkription zahlreicher zellulärer Gene, welche für den Eintritt in einen neuen Zellzyklus notwendig sind (Nevins 1992).

Das **E6**-Protein beeinflusst das Schicksal der Zelle anders. Bei sich normal entwickelnden Zellen ist die Lebensspanne einer Zelle durch ein genetisches Programm gesteuert und wird durch die Zellumgebung beeinflusst. Der natürliche Zelltod kann im Allgemeinen durch den Prozess der Seneszenz oder durch Apoptose verursacht werden. Die wichtigste Aufgabe des E6-Proteins ist, diese Prozesse und damit das Absterben der Wirtszelle zu verhindern. Eine der am besten charakterisierten Interaktionen bei der Verhinderung des Zelltods ist der Ubiquitin-vermittelte Abbau des zellulären Proteins p53 (Montevani und Banks 1999). Diese Degradation wird durch die direkte Bindung des E6-Proteins von HR-HPV-Typen an p53 initiiert. P53 ist ein proapoptotisches Protein. Durch das Entfernen des p53-Proteins aus dem zellulären Geschehen kommt es zur Deregulation des Zellzyklusses. Der Zelltod wird zugunsten der Virusreplikation verhindert. Die p53-E6-Interaktion und ihre Folgen werden detaillierter im Pkt. 1.4.2.3 beschrieben.

Die am besten untersuchten Onkoproteine dieser zweiten Proteinklasse (Regulatoren des Zellzyklusses) sind E6 und E7. Die Interaktion des E7- und des E6-Proteins sind synergistisch und führen zur Akkumulation von HPV-infizierten Zellen während des Krankheitsverlaufes. In HPV-positiven Krebszellen werden die Onkoproteine E6 und E7 stark exprimiert (Dürst *et al.* 1992).

1.4.2 Das HPV-Onkoprotein E6

1.4.2.1 Eukaryotische Genexpression, Transkriptionsfaktoren und Zinkfingermotiv

Ein Hauptcharakteristikum vielzelliger Organismen ist eine exakte Kontrolle der Genexpression. Bei Vielzellern besitzt meist jede Zelle die gesamte Erbinformation, aber die oft spezialisierten Zellen exprimieren nur einen Teil ihrer Gene in Abhängigkeit vom Wachstumsstadium oder ihrer zellulären Umgebung.

An der Steuerung der Expression vieler Gene sind Transkriptionsfaktoren beteiligt. Die Transkriptionsfaktoren lassen sich aufgrund der Aminosäuresequenzen der DNA-bindenden Domänen in mehrere strukturelle Familien einteilen. Eine Anzahl von Proteinen hat Regionen, die sich um ein zentrales Zinkion anordnen. Diese Struktur wird als Zinkfingermotiv bezeichnet. Der Name stammt aus einer zweidimensionalen Darstellung dieses Motivs, das Fingern ähnlich sieht. Bei dreidimensionaler Darstellung kann man sehen, dass die Bindung des Zinkions durch die zwei Cystein- und zwei Histidinreste in einer relativ kompakten Peptidstruktur resultiert, deren α -Helices mit der DNA binden kann. Das Zinkfingermotiv ist das am häufigsten vorkommende DNA-bindende Motiv unter den eukaryotischen Transkriptionsfaktoren. Das Zinkfingermotiv wurde primär als DNA-bindende Struktur beschrieben. Heute weiß man jedoch, dass es Proteine mit Zinkfingermotiven gibt, die nicht an DNA binden und somit auch nicht zu den Transkriptionsfaktoren gehören. Außerdem ist auch bekannt, dass das Zinkfingermotiv bei der Wechselwirkung zwischen Proteinen eine sehr wichtige Rolle spielt.

Neben Transkriptionsfaktoren können die DNA-bindenden Motive auch bei viralen Proteinen vorkommen. Für das Volllängenonkoprotein von HPV16E6 sind z.B. zwei Paar Zinkfinger motive beschrieben worden (Barbosa *et al.* 1989). Eine Zuordnung dieser zu den heute bekannten Gruppen der Zinkfinger motive ist bisher nicht publiziert worden.

1.4.2.2 Expression und Struktur des viralen Onkoproteins HPV16E6

Die DNA des HR-HPV-Typs 16 kann am häufigsten in Zervixkarzinomen nachgewiesen werden (zur Hausen 1994). Aufgrund seines hohen onkogenen Potentials ist HPV16 der am besten untersuchte Papillomavirustyp, und seine Onkoproteinexpression ist relativ gut charakterisiert. In Abb. 1/1 ist die genomische Organisation von HPV16 nach Sherman *et al.* (1992) dargestellt. Die Positionen der offenen Leserahmen sind für die einzelnen Proteine von HPV16 angegeben. Die Transkription des HPV-Genoms erfolgt polycystronisch.

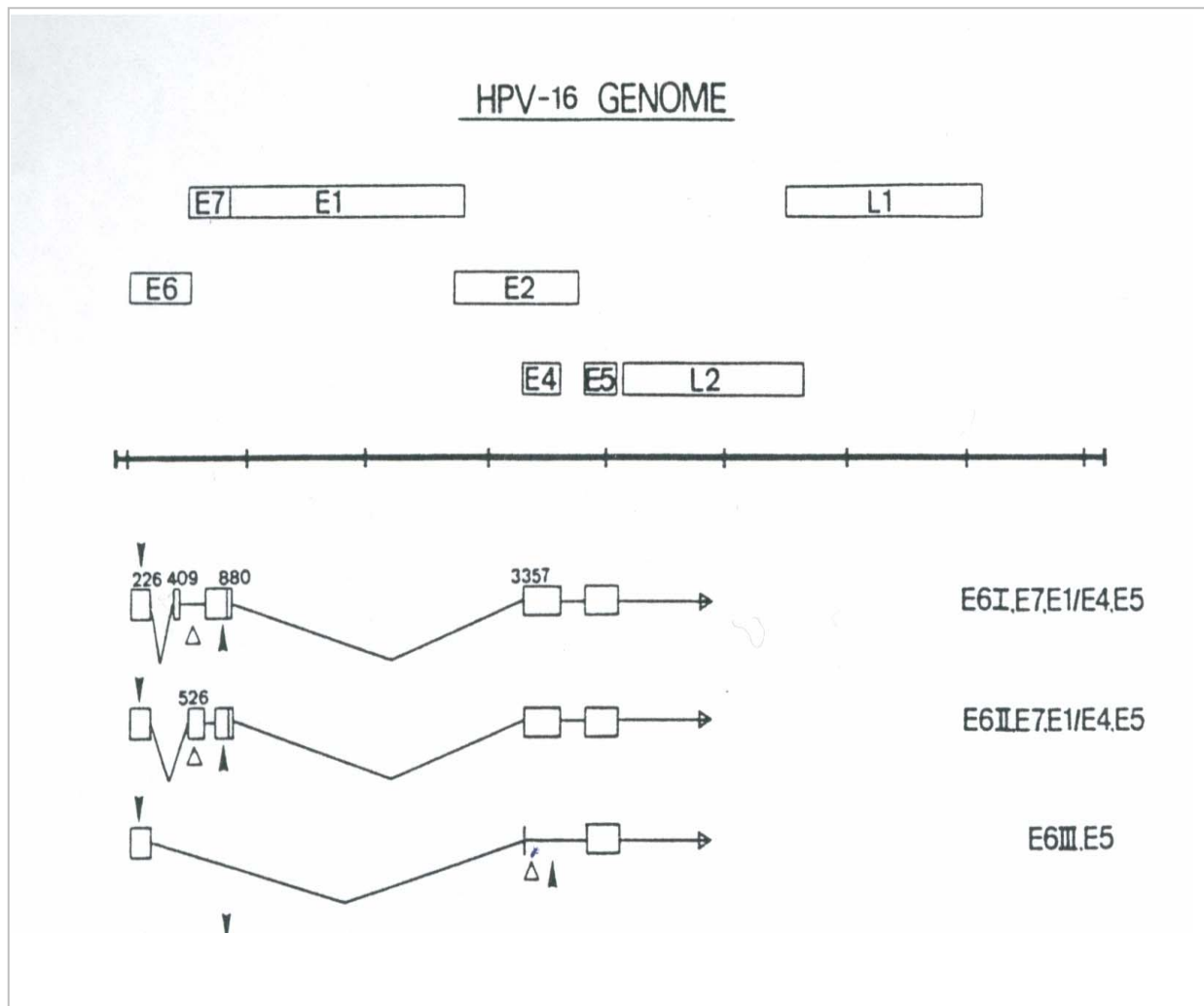


Abb. 1/1

Die Organisation des HPV16-Genoms nach Sherman *et al.* (1992). Im oberen Teil der Abb. sind die offenen Leserahmen als ungefüllte Rechtecke dargestellt. Unten wurden für die HPV16E6-Spleißvarianten I – III die Spleißdonoren und –akzeptoren aufgeführt.

Das HPV-Genom in leichten bis mittelgradigen Neoplasien liegt im Allgemeinen episomal vor, wogegen die virale DNA in Karzinomen oft ins Genom integriert auftritt (Dürst *et al.* 1985, Lehn *et al.* 1985 und 1988, Cullen *et al.* 1991). Die Integration des Virusgenoms in die Wirts-DNA erfolgt häufig durch Ringöffnung im E1-E2-kodierenden Bereich (zur Hausen 1989). Dadurch bleibt die Region, die die offenen Leserahmen für die viralen Onkoproteine E6 und E7 enthält, zusammen mit der vorgeschalteten Kontrollregion (LCR) erhalten (Schneider-Gädick 1986). Das E1- oder das E2-kodierende Gen wird dagegen unterbrochen (Dürst *et al.* 1985 und 1987, Boshart *et al.* 1984, Baker *et al.* 1987, Shirasawa *et al.* 1988). Die Expression des E1- und/oder E2-Gens ist durch die Integrationsereignisse nicht mehr möglich. E2 wurde als negativer Regulator der viralen Genexpression charakterisiert (Romanczuk *et al.* 1990, Bernard *et al.* 1989, Tan *et al.* 1992). Bei Unterbrechung des E2-Leserahmens kommt es zum Verlust der Repression der E6/E7-Onkoproteinexpression. Die ebenfalls häufige Unterbrechung des HPV E1-Genes in Karzinomen lässt vermuten, dass auch das E1-Genprodukt die Funktion eines transkriptionellen Repressors bei der viralen Genexpression ausübt (Romanczuk *et al.* 1990). Der Verlust dieser Eigenschaft führt ebenfalls zu einer Deregulation der Expression der E6-E7-Onkogene. Die Mechanismen, die diesen Prozessen zu Grunde liegen, sind nur z.T. geklärt. Fest

steht jedoch, dass es durch das Ausschalten der E1- und/oder E2-Transkription zu einer verstärkten Expression der E6- und E7-HPV-Gene und damit zu einem selektiven Wachstumsvorteil der HPV-infizierten Zelle kommt. Dieser spielt bei der malignen Progression der HPV-positiven Läsionen eine große Rolle (zur Hausen 1989).

In HPV16-positiven Karzinomen und Zelllinien werden die Gene E6 und E7 konstitutiv exprimiert (Yee *et al.* 1985, Smotkin und Wettstein 1986, Baker *et al.* 1987, Shirasawa *et al.* 1988, Sherman *et al.* 1992). Diese Beobachtung unterstrich abermals die Bedeutung der frühen viralen Gene E6 und E7 bei der Zervixkarzinogenese. Insgesamt wurden drei alternative E6-E7-Sequenzen-enthaltende mRNAs identifiziert (vgl. Tab. 1/1) (Volllängentranskript: E6, Spleißvarianten: E6I und E6II) (Smotkin *et al.* 1989). Die längste mRNA-Spezies enthielt neben anderen offenen Leserahmen des viralen Genoms (siehe Tab. 1/1) die ungespleißte Sequenz für den offenen Leserahmen von E6. Dieses Transkript ist unter anderem für die Translation des HPV16E6-Volllängenproteins verantwortlich. Bei dem E6-Volllängenonkoprotein handelt es sich um ein 151 Aminosäurenrestes langes, basisches Protein (Kanda *et al.* 1991, Lechner *et al.* 1992). Das HPV16E6-Protein enthält zwei Paar Zinkfinger motive (Barbosa *et al.* 1989).

Die anderen E6-Sequenzen-enthaltenden mRNA-Spezies (E6I, E6II und E6III) kodieren für die kürzeren Varianten des E6-Proteins. Die Funktionen der alternativ gespleißten Formen des E6-Onkoproteins sind nicht vollständig verstanden. Man nimmt aber z.B. an, dass die E6I-mRNA das Haupttranskript für die Translation des E7-Onkoproteins darstellt (Stacey *et al.* 2000). Die E6I-mRNA wird in Karzinomen und Zelllinien sehr stark exprimiert. Es wird postuliert, dass bei dieser Variante durch den kürzeren E6-Anteil eine effizientere Reinitiation der Translation erfolgen kann (Stacey *et al.* 2000).

		Kurzbezeichnung der mRNA-Spezies mit HPV16E6-Sequenzanteilen	mRNA enthält kodierende Sequenzen der HPV-Gene...	Spleißstellen im HPV-Genom
HPV16E6 Volllängentranskript	-	E6	E6, E7, E1/E4, E5	-
HPV16E6 Spleißvariante	-	E6I	E6I, E7, E1/E4, E5	E6ΔE6(I)
HPV16E6 Spleißvariante	-	E6II	E6II, E7, E1/E4, E5	E6ΔE6(II)
HPV16E6 Spleißvariante	-	E6III	E6III, E5	E6ΔE4

Tab. 1/1

Tabellarische Übersicht über die natürlich vorkommenden HPV16 E6-Varianten

1992 wurden die Expressionsmuster der individuellen Transkripte in Biopsiematerial von Zervixkarzinomen und prämaligen Karzinomvorstufen (CIN II und CIN III) untersucht (Sherman *et al.* 1992). In dieser Studie wurden Carcinoma *in situ* und CIN III, die in dieser Studie noch nicht als Carcinoma *in situ* bezeichnet wurden (vgl. Pkt. 1.2.2), als zwei verschiedene Gruppen betrachtet. Insgesamt wurden 95 Proben untersucht. Die HPV-Transkripte E6, E6I

und E6II konnten in allen Tumorbiopsien gefunden werden. Das HPV16E6-Volllängenprotein-kodierende Transkript (E6) konnte auch in allen untersuchten CIN II- und CIN III-Biopsien aufgefunden werden. In einigen CIN II- und CIN III-Biopsien wurden E6I und E6II nicht nachgewiesen. Das E6III-Transkript wurde in dem in dieser Studie untersuchten Biopsiematerial von Tumoren und Vorstufen immer exprimiert. Es kam ubiquitär in allen durch HPV verursachten zervikalen Neoplasien vor.

1.4.2.3 Wechselwirkungen von E6 mit zellulären Faktoren der Wirtszelle

Für das HPV16E6-Volllängenprotein sind mehrere Wechselwirkungen mit zellulären Faktoren in Verbindung mit der Zervixkarzinogenese beschrieben worden. Im Weiteren sollen einige der wichtigsten näher erläutert werden.

Biochemische Studien haben gezeigt, dass das E6-Protein von HR-HPV-Typen und damit auch von HPV16 in Kooperation mit dem E6-bindenden zellulären Protein E6AP (engl. **E6-Associated Protein**) mit dem Tumorsuppressorprotein p53 assoziieren kann (Huibregtse *et al.* 1991, Scheffner *et al.* 1990 und 1993, Werness *et al.* 1990). Durch die p53-E6-Interaktion kommt es zur selektiven Ubiquitin-vermittelten Proteolyse, d.h. zur Degradation von p53 und damit zur Verringerung der intrazellulären p53-Konzentration (Scheffner *et al.* 1990). In Übereinstimmung mit diesen experimentellen Befunden sind p53-Mutationen in HPV-positiven Zervixkarzinomen selten. In HPV-negativen Zervixkarzinomen kommen diese im Vergleich mit anderen humanen Tumoren sehr häufig vor (Crook *et al.* 1991). P53 ist ein multifunktionales Tumorsuppressorprotein, welches in die zelluläre Antwort auf Stress (z.B. DNA-Schädigung, Hypoxie, niedriges Ribonukleotid-Niveau oder Onkogenexpression) involviert ist. Das p53-Protein spielt bei der Aufrechterhaltung der genetischen Stabilität der Zelle eine bedeutende Rolle (Lane 1992). Durch transkriptionelle Aktivierung zellulärer Gene induziert p53 einen Zellzyklusarrest in der G1-Phase. Dieser Arrest gibt normalerweise der Zelle genug Zeit, um DNA-Schäden zu reparieren, bevor die DNA-Replikation in der S-Phase diesen Schaden manifestieren würde. Alternativ kann die Antwort auf DNA-Schäden auch ein p53-vermittelter Zelltod sein. Da p53 in die Kontrolle von DNA-Schäden während des Zellzyklusses verwickelt ist, kommt es bei der E6-bedingten Ubiquitin-vermittelten Degradation von p53 zur zunehmenden genetischen Instabilität der infizierten Wirtszelle und schließlich zur Ausbildung des transformierten Phänotyps.

Zahlreiche Experimente bewiesen, dass neben der p53-Interaktion auch noch andere Proteininteraktionen bei der Zervixkarzinogenese eine Rolle spielen müssen. Es konnte gezeigt werden, dass das E6-Protein mit dem kalziumbindenden Protein ERC-55 interagieren kann (Chen *et al.* 1995). Als weiteres Beispiel soll das durch Gao *et al.* (1999) beschriebene E6-interagierende zelluläre Protein erwähnt werden. Es wurde als E6TP1 bezeichnet (engl. **E6 Targeted Protein 1**). Dieses Protein besitzt eine hohe Homologie zu den RAP-GTPase-aktivierenden Proteinen, welche unter anderen auch bei malignen Meningiomen eine Rolle spielen (Menon *et al.* 1997, Simon *et al.* 1995, Tse *et al.* 1997).

Neben der Bindung an zelluläre Proteine und der dadurch bedingten Veränderung der Transkription bestimmter zellulärer Gene wird auch nach einer möglichen direkten Einwirkung

des HPV16E6-Proteins auf die transkriptionelle Aktivität zellulärer Gene geforscht. Wie im Punkt 1.4.2.2 bereits beschrieben, hat das HPV16E6-Volllängenprotein zwei Paar Zinkfinger motive. Eine Zuordnung der Zinkfinger motive im HPV16E6-Onkoprotein zu den heute bekannten Gruppen der Zinkfinger motive ist bis heute noch nicht publiziert worden. Es wurde jedoch gezeigt, dass doppelsträngige DNA durch das E6-Protein mit einer hohen Affinität direkt gebunden werden kann (Mallon *et al.* 1987). Der Beweis einer direkten Interaktion von HPV16E6 mit zellulären Promotoren wurde jedoch noch nicht erbracht.

Dagegen konnten Auswirkungen von HPV16E6 auf transkriptioneller Ebene durch Transaktivierung bewiesen werden. Das E6-Onkoprotein der humanen Papillomaviren hat eine Reihe transkriptionell modulierender Aktivitäten, davon sind einige, wie bereits aufgeführt, p53-abhängig, andere wurden als p53-unabhängige Effekte beschrieben (Desaintes *et al.* 1992, Etscheid *et al.* 1994, Shirasawa *et al.* 1994, Shino *et al.* 1997). HPV16E6 kann u.a. die zelluläre Fibronektin-Expression transkriptionell erhöhen (Shino *et al.* 1997) sowie den Prothymosin- α , den c-Myc- und den TGF β 1-Promotor transaktivieren (Dey *et al.* 1997, Kinoshita *et al.* 1997).

1.4.3 Die Inhibition der Differenzierung primärer Keratinozyten durch HPV16E6

1.4.3.1 Die Differenzierung von Keratinozyten

Im Verlauf der Differenzierung kommt es bei vielzelligen Organismen oft zu einer funktionellen Spezialisierung der Zellen. Dieser Entwicklungsprozess führt typischerweise von der embryonalen Zelle zur funktionell spezialisierten und nicht mehr teilungsaktiven adulten Zelle. Durch Differenzierung entstehen aus einer Ausgangszelle (meist der Zygote) im Verlauf der Ontogenese unterschiedliche Zelltypen. Differenzierung ist somit der basale Prozess der Morphogenese, er führt zur Zunahme der spatialen Multiplizität, d.h. zu einer zunehmenden Komplexität im organischen räumlichen Gefügesystem. Auf genetischer Ebene ist die Zelldifferenzierung ein hoch regulierter Prozeß.

Als Keratinozyten werden die Epithelzellen der Haut und der Schleimhäute bei Wirbeltieren bezeichnet. Der Prozess der Keratinozytendifferenzierung *in vivo* wird komplex reguliert (Watt 1989, Fuchs und Byrne 1994, Fuchs 1995). Bei diesem Prozess kommt es zu der Bildung der namensgebenden Keratine. Keratine sind Skleroproteine, die die mechanische Widerstandsfähigkeit der Haut bewirken. Primäre Keratinozyten stellen ontogenetisch gesehen selbst schon hoch spezialisierte Zellen dar. Bei der Keratinozytendifferenzierung führen sie ihre finalen Zellteilungen durch. Dieser Entwicklungsprozess wird durch den Zelltod beendet. Bei der Keratinozytendifferenzierung wandern die sich zunehmend differenzierenden Keratinozyten von der Basalschicht der Haut zur Oberfläche, sterben schließlich ab und lösen sich als Hautschuppen vom Zellverband ab.

Für Untersuchungen der Prozesse der Keratinisierung ist es möglich, humane primäre Keratinozyten *in vitro* zu kultivieren. Als primäre Keratinozyten werden die (im Vergleich zu den reifen Keratinozyten) noch relativ undifferenzierten, aber in ihrer Spezialisierung zu Keratinozyten schon festgelegten Zellen der Haut und der Schleimhäute bezeichnet, die in Zellkultur

genommen wurden und erst wenige Zellkulturpassagen hinter sich haben. Bei der Kultivierung dieser Zellen kann man den Prozess der natürlichen Differenzierung der Keratinozyten nachstellen (Boyce und Ham 1983, Schlegel *et al.* 1988). Dazu werden die Zellen nach einer Vorkultur in einem Wachstumsmedium in ein Serum- und Kalzium-haltiges Kulturmedium überführt. Dieses induziert progressive Veränderungen des Zellwachstums, der Morphologie und der Biochemie, die sich innerhalb von zwei bis drei Wochen mehr und mehr manifestieren. Das Ende der Keratinozytendifferenzierung *in vitro* ist ebenfalls der Zelltod. Charakteristisch für den Prozess der terminalen Differenzierung ist die Veränderung der Expression von Proteinen, welche das Zellwachstum kontrollieren und mit dem programmierten Zelltod in Verbindung gebracht werden (Alfandari *et al.* 1999). Es kommt u.a. zum Absinken des intrazellulären p53- und BCL2-Spiegels (Alfandari *et al.* 1999). Das den Zelltod fördernde Protein BAX dagegen wird verstärkt exprimiert (Alfandari *et al.* 1999).

Als morphologische Veränderungen (Schlegel *et al.* 1988) bei der Keratinozytendifferenzierung *in vitro* kann man eine Abflachung und Schichtung der Zellen beobachten. Nach zwei bis drei Wochen enthält die oberste Schicht der Zellkultur terminal enddifferenzierte Keratinozyten mit Keratinbündeln und kondensierten Zellkernen. Vergleichbar mit dem *in-vivo*-Geschehen lösen sich die obersten Zellen vom Zellverband ab.

1.4.3.2 Differentielle Expression der HPV-Gene in Abhängigkeit von der Gewebsdifferenzierung

Zahlreiche Untersuchungen zeigten, dass die HPV-Onkoproteine E6 und E7 in jedem Stadium der Zervixkarzinogenese exprimiert werden (vgl. Pkt. 1.4.2.2). Die Expression der Proteine E6 und E7 kann sowohl zu Beginn der Wirtszellinfektion als auch kurz vor Beendigung des Differenzierungsgeschehens beobachtet werden.

Die Expression der viralen Gene erfolgt in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad der Keratinozyten des infizierten Epithels. Die Haut, deren oberste Schichten ständig absterben, wird ausgehend von der Basalschicht permanent erneuert. Der Differenzierungsprozess erfolgt innerhalb der Haut in Richtung Hautoberfläche. Exemplarisch ist die HPV-Genexpression für einen kutanen HPV-Typ in Abb. 1/2 dargestellt. Da es sich sowohl bei der Keratinozytendifferenzierung als auch bei der HPV-Vermehrung um hoch regulierte Prozesse handelt, bestimmen die in der Zelle stattfindenden genetischen und biochemischen Veränderungen das Replikationsgeschehen des Virus. In den basalen Zellschichten des infizierten Epithels werden nur frühe virale Gene exprimiert, und es lässt sich keine massive Replikation der viralen DNA nachweisen. Mit zunehmendem Differenzierungsgrad der infizierten Keratinozyten ist eine steigende Permissivität für die Expression der Strukturgene und für die Vermehrung der viralen DNA zu beobachten. In den obersten differenzierten Zellschichten sind erstmals reife Viruspartikel zu beobachten, die dann mit den abschilfernden Hornschichten in die Umwelt freigesetzt werden. Analog zu der Expression viraler Gene in der Kutis läuft auch die Genexpression muköser HPV-Typen bei der Infektion zervikaler Keratinozyten ab.

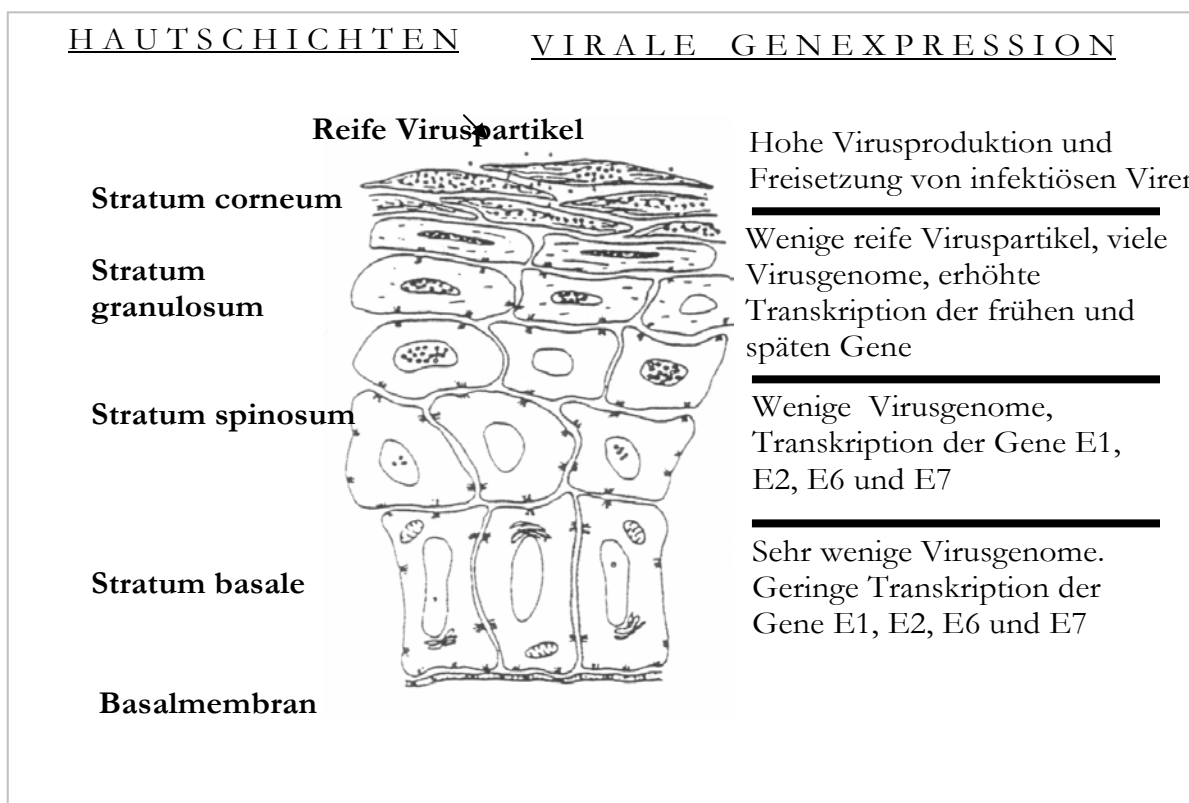


Abb. 1/2

Die Abhängigkeit der Genexpression der Papillomaviren vom Differenzierungsgrad der Zellen in der Epidermis. Die Zeichnung stellt einen Querschnitt durch die Epidermis dar. In den Zellkernen sind die Virusgenome als schwarze Kreise gekennzeichnet. Die schwarzen Punkte innerhalb und außerhalb der Zelle stellen die reifen Viruspartikel dar (modifiziert nach Modrow und Falke 1997).

1.4.3.3 Experimenteller Nachweis der Differenzierungsinhibition durch Sherman und Schlegel (1996)

Zwei Hauptmerkmale kennzeichnen neoplastisches Gewebe (vgl. Pkt. 1.2.2). Zum einen kommt es bei der Tumorprogression zu einer Erhöhung der Zellproliferationsrate und zum anderen nimmt der Differenzierungsgrad der Zellen ständig ab. Um die Wirkungsweise von humanen Papillomaviren in der Zervixkarzinogenese zu verstehen, ist es wichtig, die viralen Proteine zu identifizieren, die diese Prozesse verursachen.

Für die Untersuchung der Wirkung von E6 und E7 in ihren natürlichen Wirtszellen, den genitalen Keratinozyten, werden häufig primäre Vorhautkeratinozyten eingesetzt, da sie in größeren Mengen zur Verfügung stehen (Herkunft: Zirkumzision). Zervikale Keratinozyten kommen aufgrund der schweren Beschaffbarkeit seltener zum Einsatz. Beide Zelltypen sind natürliche Wirtszellen für HPV. Die natürliche Infektion von Vorhautkeratinozyten mit HPV kann zur klinischen Symptomatik des Peniskarzinoms führen. Eine HPV-Infektion von zervikalen Keratinozyten kann sich, wie dargelegt, zum Zervixkarzinom entwickeln.

Durch die Entwicklung des „Quantitativen-humanen-Keratinozyten-Koloniebildungs-Tests“ (Schlegel *et al.* 1988) war es möglich, in quantitativer Weise die transformierenden Eigenschaften der HPV-Proteine in humanen Keratinozyten zu studieren. Der Test beruhte auf der Beobachtung, dass sich normal verhaltende humane primäre Vorhaut-Keratinozyten ausdif-

ferenzieren, wenn sie in ein Medium mit den Differenzierungsstimuli Kalzium und Serum überführt werden (vgl. Pkt. 1.4.3.1). Wurden die Zellen dagegen mit dem HPV16-Genom transfiziert, proliferierten sie z.T. weiter, differenzierten sich nicht und bildeten durch dieses Verhalten nach einiger Zeit makroskopisch als klare Plaques erkennbare Kolonien aus. Diese Kolonien befanden sich auf einem Hintergrund sich differenzierender Keratinozyten, die auf die Differenzierungsstimuli normal reagiert hatten. Die durch den „Quantitativen-humanen-Keratinozyten-Koloniebildungs-Test“ nach Schlegel *et al.* (1988) erhaltenen Ergebnisse wurden durch Auszählen der sichtbaren Kolonien (Plaques) je Kulturgefäß quantifiziert. Die Anzahl der entstandenen Kolonien pro Mikrogramm transfizierter DNA war ein Maßstab für die transformierenden Eigenschaften der jeweiligen untersuchten Probe.

Schlegel *et al.* (1988) konnten mit dem „Quantitativen-humanen-Keratinozyten-Koloniebildungs-Test“ auch zeigen, dass die gemeinsame Transfektion der Onkoproteine E6 und E7 des HR-HPV-Typs 16 in humane primäre Keratinozyten ausreichend ist, um die Koloniebildung auszulösen. Die für die Tumorentstehung wichtigen Prozesse der Immortalisierung und des Verlustes des Differenzierungsvermögens mussten also direkt an diese beiden viralen Proteine E6 und E7 gekoppelt sein und bedurften keiner Kooperation mit den restlichen viralen Proteinen. Eine weitere, genauere Aufteilung der Eigenschaften auf HPV16E6 bzw. HPV16E7 war damals nicht möglich (Schlegel *et al.* 1988). Es kam weder durch alleinige Transfektion von E6 noch durch E7 zur Ausbildung von differenzierungsresistenten Kolonien.

1996 veröffentlichten Sherman und Schlegel eine Arbeit, in der erneut der „Quantitative-humanen-Keratinozyten-Koloniebildungs-Test“ zum Einsatz kam. Der Test wurde dabei jedoch leicht modifiziert durchgeführt. Die Genexpression der viralen Onkoproteine erfolgte vom frühen SV-40-Promotor. Im Vergleich zum von Schlegel *et al.* (1988) verwendeten Aktin-Promotor ist der frühe SV40-Promotor stärker. Durch diese Modifikation des Originalprotokolls wurde eine deutliche Zunahme der Genexpression erzielt. Mit dem veränderten „Quantitativen-humanen-Keratinozyten-Koloniebildungs-Test“ wurden durch Sherman und Schlegel (1996) erneut die Aktivitäten der HPV16-Proteine E6 und E7 untersucht. Es konnten die Ergebnisse von Schlegel *et al.* (1988) bestätigt werden. Es wurde gezeigt, dass durch Kotransfektion von HPV16E6 und HPV16E7 differenzierungsresistente Kolonien entstehen (Abb. 1/3). Interessanterweise und im Kontrast zu den 1988 erzielten Ergebnissen konnten durch Sherman und Schlegel (1996) auch dann differenzierungsresistente Keratinozyten beobachtet werden, wenn HPV16E6 alleine in die Zellen transfiziert wurde (siehe Abb. 1/3). Die Aktivität des HPV16E6-Onkoproteins war somit ausreichend, um den undifferenzierten Phänotyp von Keratinozyten zu induzieren bzw. zu erhalten.

Um diese Aussage zu untermauern, wurden die Keratinozyten, die mit HPV16E6 allein und mit HPV16E6 und HPV16E7 kotransfiziert wurden, miteinander verglichen. Die Kolonien (Plaques) wurden mikroskopisch untersucht. Dabei konnte kein Unterschied im Differenzierungsgrad der Keratinozyten festgestellt werden. Man schlussfolgerte, dass das HPV16E6-Onkoprotein suffizient ist, die Differenzierung der Keratinozyten zu inhibieren.

Auf makroskopischer Ebene konnten dagegen Unterschiede festgestellt werden. HPV16E6-transfizierte Zellen waren zwar differenzierungsresistent, im Gegensatz zu HPV16E6- und HPV16E7-kotransfizierten Zellen konnten sie jedoch nicht zu immortalen Zelllinien auswachsen. Das Vermögen von HPV16E6, die Differenzierung von Keratinozyten zu inhibieren, konnte somit klar von den immortalisierenden Eigenschaften von E6 getrennt werden, wozu es bei Keratinozyten einer Kooperation mit E7 bedarf.

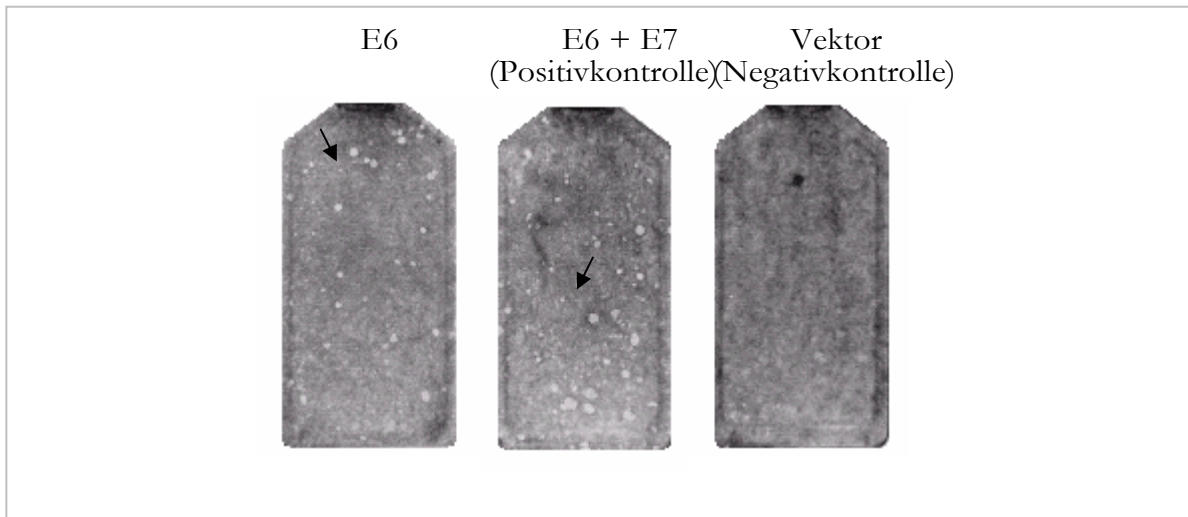


Abb. 1/3

Die Induktion differenzierungsresistenter Keratinozytenkolonien durch singuläre Transfektion von HPV16E6 (Sherman und Schlegel 1996). Als Positivkontrolle dienten Keratinozyten, welche mit HPV16E6/E7 kotransfiziert wurden und als Negativkontrolle Keratinozyten, welche mit dem Leervektor transfiziert wurden. Die Kultivierungsflaschen sind von oben fotografiert worden. Die Kolonien differenzierungsresistenter Zellen sind in der Abb. als helle Flecken erkennbar (siehe schwarze Pfeile).

Um die AS-Sequenz des HPV16E6-Onkoproteins zu identifizieren, die für die Auslösung der Differenzierungsresistenz durch HPV16E6 entscheidend ist, wurde der „Quantitative-humane-Keratinozyten-Koloniebildungs-Test“ anschließend auch mit HPV16E6-Varianten und HPV16E6-Deletionsmutanten durchgeführt. Die natürlich vorkommenden Spleißvarianten HPV16E6I - III konnten den differenzierungsresistenten Phänotyp nicht auslösen. Das carboxyterminale Ende des HPV16E6-Onkoproteins musste somit notwendig sein, um die Resistenz gegenüber den Differenzierungsfaktoren Kalzium und Serum zu vermitteln.

Durch den Einsatz von künstlich erzeugten Deletionsmutanten konnte der für die Differenzierungsinhibition wichtige Bereich noch genauer determiniert werden. Die Deletion der Aminosäurereste 141 - 151 vom carboxyterminalen Ende des HPV16E6-Proteins hatte keinen Einfluss auf die differenzierungsinhibitorischen Eigenschaften. Die Anzahl, die Größe und das Erscheinungsbild der erzeugten differenzierungsresistenten Kolonien waren mit den durch das undeletierte HPV16E6-Protein erzeugten vergleichbar. Deletionen wurden weiterhin für den Bereich Cys-X-X-Cys des zweiten Zinkfinger-Motives durchgeführt (Deletion der AS 132 - 151). Diese zweite Deletion führte zu einem völligen Verschwinden der Inhibition des Differenzierungsvermögens von HPV16E6. Die Eigenschaft des HPV16E6-Proteins, die Differen-

zierung zu inhibieren, war folglich von den deletierten Aminosäureresten 132 - 141 und somit vom zweiten Zinkfingermotiv abhängig. Durch Sherman und Schlegel (1996) wurde mit den durchgeführten Experimenten gezeigt, dass die Inhibierung der Differenzierung von humanen Keratinozyten eine Eigenschaft darstellt, die für das HPV16E6-Volllängenprotein charakteristisch ist, nicht aber für die natürlich vorkommenden E6-Spleißvarianten.

1.5 Zielsetzung und experimentelles Design

Punkt 1.4.3.3 der Einleitung beschrieb ausführlich, wie durch Sherman und Schlegel (1996) gezeigt wurde, dass das Volllängen-HPV16E6-Onkoprotein suffizient ist, um die Serum- und Kalzium-induzierte Differenzierung von humanen primären Keratinozyten zu inhibieren. Dieses Experiment warf eine Menge unbeantworteter Fragen auf und stellte gleichzeitig das Instrument zur Beantwortung dieser Fragestellungen dar.

Der Prozess, durch welchen HPV16E6 nach Transfektion in humane primäre Keratinozyten die Resistenz gegenüber der Serum- und Kalzium-induzierten Differenzierung hervorruft, ist heute noch nicht vollständig verstanden. Es wird aber davon ausgegangen, dass mindestens zwei Mechanismen existieren, durch die HPV16E6 die Differenzierungsprozesse von Keratinozyten beeinträchtigen kann. Als Erstes ist es möglich, dass die Abundanz differenzierungsspezifischer zellulärer Faktoren durch direkte Protein-Protein-Interaktion verändert wird. Zweitens besteht die Möglichkeit, dass die Transkription zellulärer differenzierungsspezifischer Gene durch Transaktivierung oder direkte Wechselwirkung des HPV16E6-Onkoproteins mit zellulären Promotoren beeinflusst werden kann.

Ziel dieser Arbeit war es zu zeigen, ob es Veränderungen der Genexpression auf transkriptionellem Niveau durch HPV16E6 gibt. Bei positivem Befund sollten zelluläre differenzierungsspezifische Gene identifiziert werden, die durch HPV16E6 auf der Ebene der Transkription dereguliert wurden. Die Experimente von Sherman und Schlegel (1996) wurden dafür modifiziert wiederholt (Material und Methoden Pkt. 2.2.1). Die zu untersuchenden RNAs wurden aus HPV16E6-exprimierenden primären Vorhaut-Keratinozyten sowie aus den Leervektor-transduzierten Kontrollzellen des gleichen Ursprungs isoliert. Als molekularbiologische Analyse-Methode sollte primär das „Differential Display of mRNA“ (Liang und Pardee 1992) eingesetzt werden. Aufgrund der erhaltenen Ergebnisse und der Fortschritte in der Molekularbiologie wurden die Untersuchungen durch die cDNA-Array-Technologie erweitert.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Geräte

Allgemeine Chemikalien:

Acrylamid	SIGMA	Isopropylthiogalctosid	SIGMA
Agar	DIFCO	Kaliumchlorid	MERCK
Agarose	ROTH	Kalziumchlorid	SIGMA
APS	GIBCO BRL	RapidGel™-XL-40% Concentrate	USB™
Ampizillin	SIGMA	Magnesiumchlorid	MERCK
Äthanol	J.T. Baker	Magnesiumsulfat	MERCK
Azeton	MERCK	β-Mercaptoäthanol	MERCK
Bactotrypton	REMEL	Mineralöl für PCR	SIGMA
Borsäure	MERCK	MOPS	ROTH
Bromphenolblau	MERCK	Natriumazetat	MERCK
Chill-out 14™ Liquid Wax	Nalgene	Natriumchlorid	MERCK
Chloroform	MERCK	Natriumhydrogenphosphat-Monohydrat	MERCK
DEPC	SIGMA	Natriumhydroxid	MERCK
Dimethylformamid	SIGMA	Natriumlauroylsarkosinatkonzentrat	MERCK
Dimethylsulfoxid	SIGMA	Natriumzitat	MERCK
Di-Natriumhydrogenphosphat	MERCK	N,N-Dimethylformamid	SIGMA
D-Glukose	SIGMA	N,N'-Methylen-Bis-Acrylamid	SIGMA
EDTA	MERCK	TEMED	SIGMA
Essigsäure	MERCK	PBS-Lösung	GIBCO BRL
Ethidiumbromid	SIGMA	Phenol	GIBCO BRL
Express-Hybridisierungslsg.	Clontech	Phenol:Chloroform: Isoamylalkohol (25:24:1)	GIBCO BRL
Ficoll 400	ICN	Polyvinylpyrrolidon	SIGMA
Formaldehydlsg. 37%	MERCK	BSA	SIGMA
Formamid	MERCK	Saccharose	MERCK
Glykogen	SIGMA	SDS	SIGMA
Glyzerin	SIGMA	Salzsäure	MERCK
Guanidinthiocyanat	SIGMA	t-RNA	Boehringer Mannheim
Harnstoff	SIGMA	TRIS	SIGMA
Hefeextrakt	REMEL	X-Gal	APPLICHEM
Heringssperma-DNA	SIGMA	Xylencyanol	MERCK
Isoamylalkohol	MERCK	Zitronensäure	SIGMA
Isopropanol	MERCK		

Verbrauchsmaterialien

Chroma Spin 200	Clontech	Petrischalen	Greiner
GeneAMP®Reaction Tubes (PCR-Tubes)	Perkin Elmer	Quick Spin Columns	Roche
Falcon-Reaktionsgefäße (15 und 50 ml)	Sarstedt	Röntgenfilm X-omat AR5	Kodak
Hybridisierungsflaschen (15 cm)	Boeckel Scientific	Sterilfilter 45 µm und 20 µm	Schleicher & Schuell
Hyperfilm β-max	Amersham Life Science	Whatmann 3MM-Papier	Schleicher & Schuell
Kryoröhrchen	Sarstedt	1,5 und 2,0 ml Tubes	Eppendorf
Nylonmembran	Boehringer Mannheim	96 Loch-Platten für PCR	Biozym

Enzyme und Nukleotide:

COT1-DNA	GIBCO BRL	α ³² P-dATP (3000 Ci/mmol)/10mCi/ml	NEN™
dNTPs	Boehringer Mannheim	RNasin	Promega
λ HIND III (DNA-Molekulargewichtsmarker)	Stratagene, Heidelberg	RQ1-DNase	Promega
Eco RI	New England Biolabs	Superscript™ II-Reverse Transkriptase	GIBCO BRL
Lysozym	SIGMA,	Thermoprime (+)-Taq-Polymerase	Advanced Biotechnologies
M-MLV Reverse Transkriptase	GIBCO BRL		

Geräte:

Agarose-Gelelektrophoresevorrichtung. Blue Marine 200	Serva	PCR-Gerät (Biometra® UNO II)	BIOMETRA
Blotvorrichtung (Vakuumblotter 270 BR)	BIO-RAD	PCR-Gerät (DNA-Thermal Cyclor)	Perkin Elmer
Bioscan/QC 4000 XER (Radioaktivitätszähler)	Bioscan Incop.	Phosphor Imaging System Molecular Imager™ Model GS-250	BIO-RAD
Licor DNA-Sequencer Model 4000	MWG- Biotech		
DOT-Blot-Anlage	BIOMETRA	Photospektrometer (Spectronic Genesys 2)	Milton Roy
Expositionskassetten“Kodak x-omatic cassette“	Kodak	Spannungsgerät für Agarosegele: Biometra-Power- Pack p25	BIOMETRA
Geltrockner „Modell 583“	BIO-RAD	Spannungsgerät für PAA-Gele: Consort E734	Fröbel Labortechnik
Hybridisierungsöfen	Heraeus	Speedvac RC 10.22.	Jouan
Kühlzentrifuge 5417R	Biometra	Thermomixer Comfort	Eppendorf
Laborwaage	Sartorius	UV-Crosslinker GS Gene Linker™	BIO-RAD
Megafuge 1.0 R	Heraeus	UV-Leuchttisch	Sigma
Achtkanalpipette	Eppendorf	Vortex-Genie 2	Scientific Industries
PAA-Gelelektrophoresevorrichtung (20 x 60 cm)	BIORAD	Wasserbad Julabo	Julabo
PCR-Gerät (Eppendorf Mastercycler Gradient)	Eppendorf	Wasserschüttelbad 1083	GFL

Advanced Biotechnologies, Columbia, USA; Amersham Life Science; Buckinghamshire, UK; Applichem, Darmstadt, Deutschland; Biorad, München, Deutschland; Bioscan Incop., Washington, USA; Biometra, Göttingen, Deutschland; Biozym, Oldendorf, Deutschland; Boeckel Scientific, Hamburg, Deutschland; Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland; Clontech, Palo Alto, USA; Difco, Detroit, USA; GFL, Burgwedel, Deutschland; GIBCO BRL, Eggenstein, Deutschland; Eppendorf, Hamburg, Deutschland; Greiner, Frickenhausen, Deutschland; Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland; Julabo, Seelbach, Deutschland; Jouan, Unterhaching, Deutschland; JT Baker, De Venter, Holland; ICN Biomedicals Inc., Aurora, USA; Kodak, USA; MERCK, Darmstadt, Deutschland; Milton Roy, Rochester, USA; MJ Research Incop, USA; Nalgene, Rochester, USA; MWG-Biotech, Teddington, UK; NEN™, Boston, USA; New England Biolabs (NEB), Schwalbach, Deutschland; Perkin Elmer, Worwalk, USA; Remel, Lenexa, USA; Promega, Madison, USA; Roche, Idianapolis, USA; Roth, Karlsruhe, Deutschland; Sartorius, Göttingen, Deutschland; Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland; Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland; Serva/Boehringer Ingelheim, Deutschland; Sigma, Deisenhofen, Deutschland; Stratagene, Heidelberg, Deutschland

2.2 RNA-Präparationen**2.2.1 Die modifizierte Wiederholung der Experimente von Sherman und Schlegel (1996)**

In den späten 90-er Jahren setzte es sich durch, Gene in humane primäre Keratinozyten durch retrovirale Transduktion einzubringen. Diese Methode ist im Vergleich zur Transfektion von eukaryotischen Zellen mit Plasmiden effizienter. Die Protokolle von Sherman und Schlegel (1996) wurden deshalb modifiziert. Statt einer Transfektion der Zelle mit einem HPV16E6-exprimierenden Plasmid wurde eine retrovirale Infektion der humanen primären Vorhaut-Keratinozyten durchgeführt. Dafür wurde das durch Foster und Galloway (1996) beschriebene, auf dem LXSXN-Vektor basierende, HPV16E6-exprimierende Vektorkonstrukt benutzt. Die Transkription der HPV-Gene erfolgte auch bei der viralen Transduktion vom frühen SV40-Promotor aus. Die retrovirale Infektion von Keratinozyten und die dadurch initiierte Expression des HPV16E6-Volllängenonkoproteins resultierten ebenfalls in der Ausbildung von differenzierungsresistenten Kolonien aus Keratinozyten mit einem undifferenzierten Phänotyp (persönliche Mitteilung Whitaker und Sherman).

In Abb. 2/1 ist die für diese Arbeit durchgeführte retrovirale Infektion von Keratinozyten schematisch dargestellt. In Kultur genommene menschliche Vorhautkeratinozyten der 4. – 5. Passage wurden vor der Behandlung mit den retroviralen Vektoren 1:2 gesplittet, so dass zwei

identische Ausgangspopulationen von Zellen in zwei verschiedenen Kulturgefäßen weiterkultiviert wurden. Die Zellen im ersten Kulturgefäß wurden mit dem leeren retroviralen Vektor (LXSN) transduziert. Dadurch war es möglich, die Veränderungen der Genexpression, die auf die retrovirale Infektion selbst zurückzuführen waren, von denen, die auf dem zu untersuchenden Gen beruhen, zu unterscheiden. Die Zellen im zweiten Kulturgefäß wurden mit dem Gen für HPV16E6 transduziert. 24 Stunden nach Transduktion wurde ein zweites 1:2-Splitting durchgeführt. Je eine Hälfte der gesplitteten Zellen (LXSN- oder HPV16E6-transduziert) wurde anschließend in dem die Differenzierung von Keratinozyten nicht auslösenden KSFM (engl.= **k**eratinocyte **s**erum **f**ree **m**edium) weiterkultiviert (Schlegel *et al.* 1988). Die andere Hälfte der Zellen wurde in ein Medium überführt, welchem hohe Konzentrationen von Kalzium und Serum zugesetzt worden sind (Schlegel *et al.* 1988). Diese beiden Faktoren lösen bei normalen Keratinozyten die Differenzierung aus (siehe Pkt. 1.4.3.1). Die Zellen wurden 48 Stunden nach dem letzten Mediumwechsel geerntet. Die RNA wurde nach der GTC-Methode isoliert (Pkt. 2.2.2).

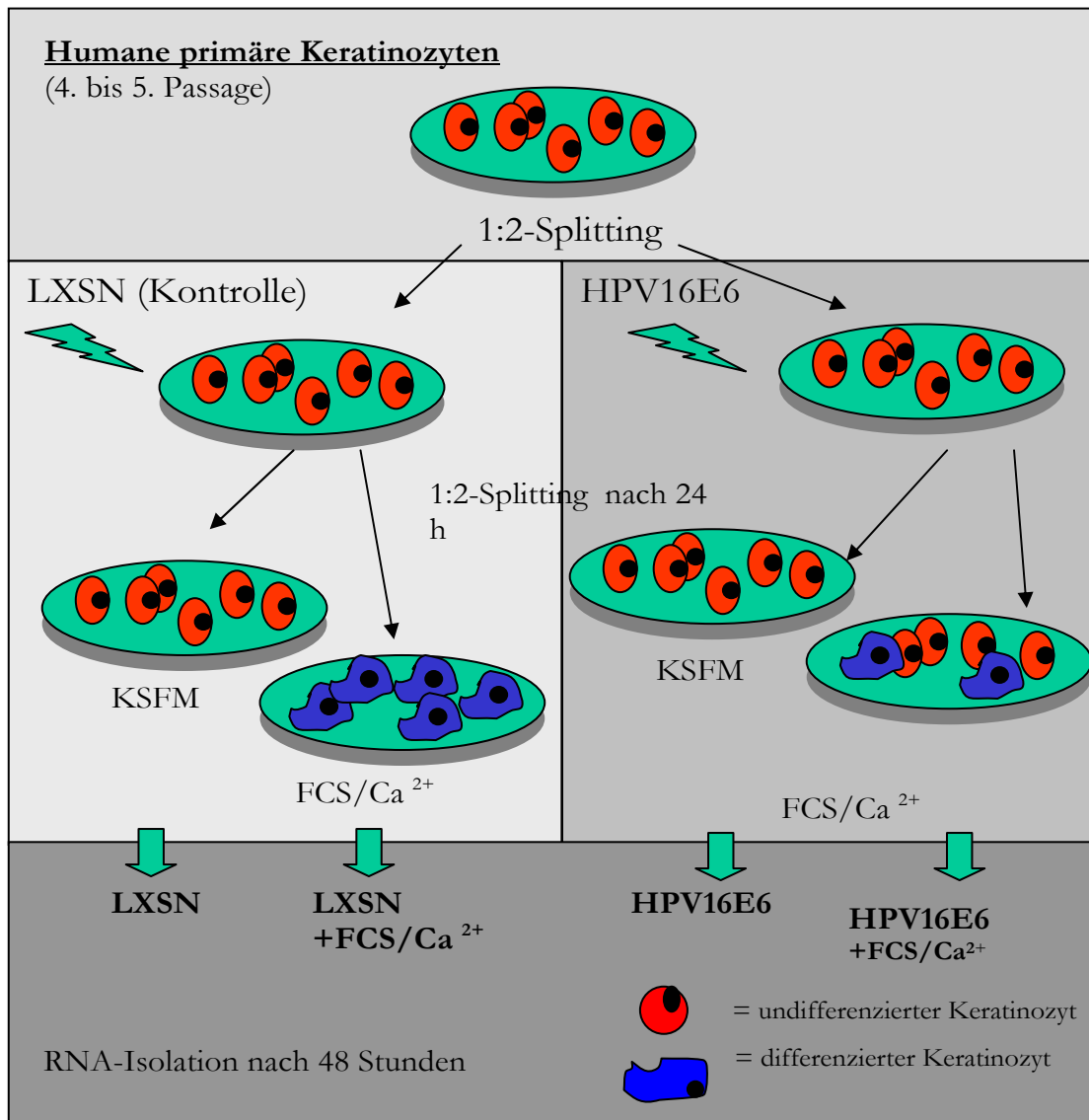


Abb. 2/1

Retrovirale Transduktion humaner primärer Keratinozyten mit HPV16E6

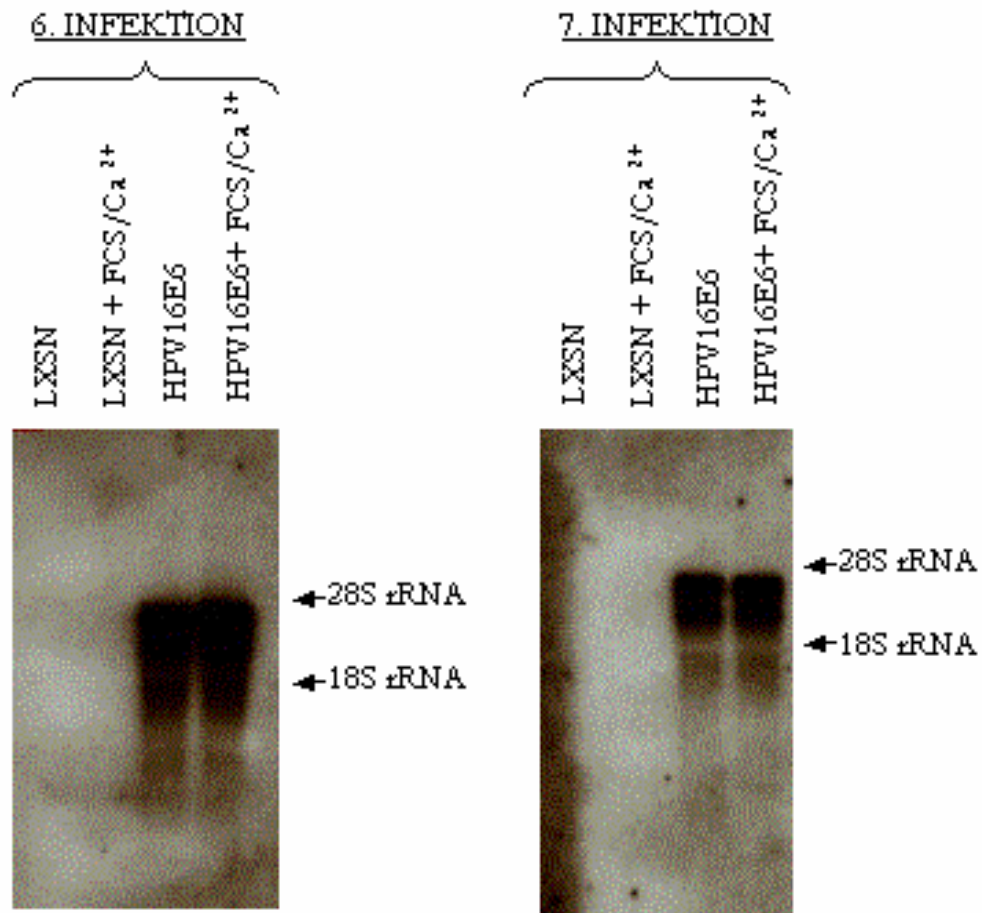


Abb. 2/2

Nachweis der erfolgreichen Transduktion des HPV16E6-Gens in humane primäre Keratinozyten (exemplarisch für die 6. und 7. Infektion) durch Northern-Blot-Hybridisierung. Mit einer HPV16E6-spezifischen Sonde konnte gezeigt werden, dass HPV16E6 exprimiert wurde. Je Spur wurden 5 µg RNA der jeweils gekennzeichneten Probe im Agarosegel nach dem Molekulargewicht aufgetrennt.

Bei zusätzlichen Untersuchungen der durch das HPV6E6-Protein verursachten differentiellen Genexpression wurde anstelle des anfänglichen 1:2-Splittings ein 1:3-Splitting durchgeführt und weiter wie für die LXS- und HPV16E6-transduzierten Zellen vorgegangen. In die Keratinozyten des resultierenden dritten Kulturgefäßes wurde dann retroviral das für das HPV6E6-Protein kodierende Gen eingebracht. HPV6 ist nicht mit der Zervixkarzinogenese assoziiert. Er gehört zu den LR-HPV-Typen, die den Genitaltrakt befallen. Seine viralen Gene werden in Experimenten oft als Kontrolle genutzt, um Eigenschaften, die für HR-HPV-Typen spezifisch sind von denen, die allen HPV-Typen gemeinsam sind, zu unterscheiden. Die Transduktion des HPV6E6-Gens führt nicht zur Ausbildung differenzierungsresistenter Keratinozytenkolonien.

2.2.2 Die RNA-Extraktion nach der GTC-Methode (Chomczynski und Sacchi 1987)

Zur RNA-Extraktion wurden die adhärennten Zellen im Kulturgefäß nach Entfernung des Kultivierungsmediums zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit der GTC-Lösung (0,05 ml je cm² Kulturgefäß) lysiert. Das Lysat wurde in Falcon-Reaktionsgefäße überführt und eingefroren zwischengelagert bzw. sofort weiterbearbeitet. Die Präparation der RNA erfolgte in 15 ml- bzw. 50 ml-Falcon-Reaktionsgefäßen. Wenn notwendig, wurde das GTC-Zelllysate im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Jeweils einem Volumen GTC-Zelllysate wurden nacheinander 1/10 Volumen 2M Natriumazetat pH=4,0, 1 Volumen saures Phenol sowie 1/5 Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (49:1-Gemisch) zugegeben. Nach Zugabe jeder Komponente wurde der Inhalt durch mehrmaliges Kippen des Reaktionsgefäßes vorsichtig gemischt. Anschließend wurde das Reaktionsgefäß 10 s gut geschüttelt und für 15 min auf Eiswasser inkubiert. In der Megafuge erfolgte eine 20-minütige Zentrifugation bei 6000 rpm und 0 °C. Die Oberphase wurde ohne Anteile der Interphase abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Es erfolgte eine Zugabe des gleichen Volumens Isopropanol. Anschließend wurde der Inhalt des Reaktionsgefäßes mit dem Isopropanol gemischt. Dieses Gemisch wurde 60 min bei -20 °C gelagert und danach 30 min bei 6000 rpm und 0 °C in der Megafuge zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das am Reaktionsgefäßboden entstandene Pellet wurde im halben Ausgangsvolumen frischer GTC-Lösung aufgenommen. Schlechte Lösbarkeit des Pellets wurde durch Erwärmen auf 37 °C im Wasserbad behoben. Nach Auflösen des Pellets wurde ein gleiches Volumen Isopropanol zugegeben. Es folgten eine erneute Inkubation bei -20 °C für 60 min und eine sich daran anschließende Zentrifugation bei 3000 rpm für 15 min bei 0 °C. Das entstandene Pellet wurde zweimal mit 500 µl 75 %igem Alkohol (mit DEPC-Wasser verdünnt) gewaschen und erneut durch eine 5-minütige Zentrifugation bei 3000 rpm und 0 °C sedimentiert. Anschließend wurde das RNA-Pellet luftgetrocknet und in DEPC-behandeltem Aqua dest. gelöst (50 – 200 µl je nach Ausgangsmenge). Die Lagerung der extrahierten RNA war bei -80 °C über mehrere Jahre möglich.

<u>GTC-Puffer („Lösung D“)</u>	<u>Herstellung des DEPC-Wassers</u>
4 M Guanidinisothiocyanat (GTC)	0,1 % DEPC (DEPC = Diethylpyrocarbonate)
25 mM Natriumzitat	z.B. 1 ml DEPC in 1 Liter Aqua dest.
0,5 % Natriumlauroylsarkosinat	mindestens zwei Stunden inkubieren bei Raumtemperatur
2 % β-Mercaptoäthanol (unmittelbar vor Gebrauch zusetzen)	Autoklavieren 20 min bei 120 °C

2.2.3 Zusammenstellung der verwendeten RNA-Extraktionen

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurden RNAs aus verschiedenen, unabhängigen Transduktionsexperimenten verwendet. In Tab. 2/1 sind die unabhängigen RNA-Extraktionen nach viraler Transduktion von humanen Keratinozyten aufgeführt.

RNA-Extraktion	Durchführung	Transduktion	Verwendung
1. Extraktion	Noel Whitaker, DKFZ Heidelberg, Deutschland	LXSN, HPV16E6	„Differential Display of mRNA“
3. Extraktion	Noel Whitaker, DKFZ Heidelberg, Deutschland	LXSN, HPV16E6	„Differential Display of mRNA“
4. Extraktion	Noel Whitaker, DKFZ Heidelberg, Deutschland	LXSN, HPV16E6, HPV6E6	„Differential Display of mRNA“, ATLAS™-cDNA-Arrays Reverse-Northern-Blot-Analysen Northern-Blot-Analysen
5. Extraktion	Noel Whitaker, DKFZ Heidelberg, Deutschland	LXSN, HPV16E6, HPV6E6	„Differential Display of mRNA“, ATLAS™-cDNA-Arrays Reverse-Northern-Blot-Analysen Northern-Blot-Analysen
6. Extraktion	Levana Sherman Sackler School of Medicine, Tel Aviv, Israel	LXSN, HPV16E6	Northern-Blot-Analysen
7. Extraktion	Levana Sherman Sackler School of Medicine, Tel Aviv, Israel	LXSN, HPV16E6	Northern-Blot-Analysen

Tab. 2/1

Übersicht über die unabhängigen RNA-Extraktionen. Angegeben sind die Kooperationspartner, in deren Labors die Transduktionsexperimente durchgeführt wurden, die viralen Gene, die transduziert worden sind (bzw. Leervektor (LXSN)) sowie die Methoden zur Untersuchung der Genexpression, für die die RNA-Extraktionen innerhalb dieser Arbeit genutzt worden sind.

2.3 Differential Display of mRNA

2.3.1 Das Prinzip des „Differential Display of mRNA“

Die Methode des „Differential Display of mRNA“ wurde erstmals durch Liang und Pardee (1992) beschrieben. Mit dieser PCR-Anwendung ist es möglich, Unterschiede auf mRNA-Ebene in vergleichbaren Zellpopulationen darzustellen. Das „Differential Display of mRNA“ beruht auf dem Prinzip der RT-PCR. Abb. 2/3 gibt einen schematischen Überblick über die einzelnen Schritte der Methode. Als Erstes wird aus den gegeneinander zu testenden Zellpopulationen die Gesamt-RNA isoliert. Ein anschließender DNase-Verdau beseitigt Kontaminationen der RNA mit genomischer DNA, welche zu falsch positiven Ergebnissen führen können. Die mRNA wird danach mit reverser Transkriptase zu cDNA umgeschrieben. Dafür werden Primer mit einem Poly(I)-Bereich eingesetzt. Vor dem Poly(I)-Bereich liegen je zwei Basen, die alle Kombinationen von aufeinander folgenden Basen darstellen. Die Poly(I)-Primer werden auch als reverse Primer bezeichnet. Mit diesen Primern ist gewährleistet, dass rein theoretisch jede in der Probe enthaltene mRNA bei der reversen Transkription erfasst wird.

In der sich anschließenden PCR wird mit einem Gemisch aus reversem Primer und einem Zufallsprimer gearbeitet. Bei den Zufallsprimern handelt es sich um ein Primerset, das aus etwa 36 Primern besteht (Bauer *et al.* 1993, Nees 1997), die sehr häufige Basenabfolgen in Genen erkennen. Die PCR wird unter wenig stringenten Bedingungen durchgeführt. Die Annealingtemperaturen liegen bei 38 °C bzw. 40 °C.

„Differential Display of mRNA“

(schematischer Überblick)

1. Isolation von Gesamt - RNA

5' ————— 3' mRNA

2. Reverse Transkription

- + Reverser Primer z.B. GCTTTT*TT*TT*TTT
- + M-MLV Reverse Transkriptase
- + dNTPS

5' ————— mRNA ————— 3' CGAAAAAAAAAAAAA
 3' ————— cDNA ————— GCTTTT*TT*TT*TTT 5'

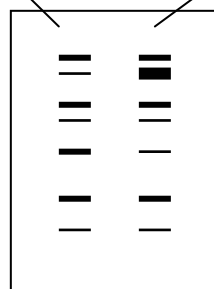
3. PCR - Amplifikation

- + Reverse Primer z.B. GCTTTT*TT*TT*TTT
- + Zufalls-Primer z.B. GCTACCATGGCT
- +TAQ- Polymerase
- + dNTPS

5' ————— 3'
 CGATGGTACCGA ————— CGAAAAAAAAAAAAA
 3' ————— GCTACCATGGCT ————— GCTTTT*TT*TT*TTT 5'
 RT-cDNA

4. Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zelltyp 1 Zelltyp 2



- Banden unterschiedlicher Intensität detektieren
- Banden aus dem Gel ausschneiden

5. Reamplifizierung und Klonierung

Northern-Blot-Hybridisierung,
 RNase-Protection- Assay,
 Reverser Northern Blot

Sequenzierung,
 Sequenzvergleich mit
 Datenbanken

Abb. 2/3

Allgemeiner schematischer Überblick über die molekularbiologische Methode des „Differential Display of mRNA“ (Liang und Pardee, 1992)

Zum späteren Nachweis der Amplifikate ist eines der in der PCR eingesetzten Nukleotide radioaktiv markiert (z.B. α - ^{32}P dATP). Es entstehen Amplifikate unterschiedlicher Länge (100-1000 bp). Die sich entsprechenden Ansätze aus Probe und Vergleichsproben, die mit dem gleichen reversen Primer und dem gleichen Zufallsprimer durchgeführt werden, werden nebeneinander auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen und aufgetrennt. Es folgt eine Exposition auf Röntgenfilm. Im Autoradiogramm ist die in beiden Zellpopulationen vorhandene mRNA als Bande auf gleicher Höhe zu erkennen. Die in der einen oder anderen Zellpopulation stärker oder schwächer ausgeprägten PCR-Banden stellen die differentiell exprimierten Gene dar. Banden mit gleicher Stärke wurden in den Zellen trotz unterschiedlicher experimenteller Bedingungen konstitutiv exprimiert. Um die differentiell exprimierten mRNAs näher zu charakterisieren, werden die interessanten Banden aus dem Gel eluiert.

Durch die Möglichkeit des Auftretens falsch positiver Banden (PCR-Artefakte) muss die differentielle Expression über andere molekularbiologische, nicht amplifizierende Methoden bestätigt werden. Bei Vorhandensein größerer mRNA-Mengen ist bei der Verifikation der „Differential Display of mRNA“ der konventionelle Northern-Blot zu bevorzugen. Der Reverse-Northern-Blot kommt dann zum Einsatz, wenn die zu untersuchende mRNA aus experimentellen Gründen nur in begrenzten Mengen zur Verfügung steht.

Trotz des großen Arbeitsaufwandes für die Verifizierung der „Differential Display of mRNA“-Ergebnisse, bedingt durch die Anfälligkeit der Methode für falsch positive Ergebnisse, stellt sie beim heutigen Stand der cDNA-Array-Technologie eine interessante Methode dar, um differentiell exprimierte unbekannte oder noch nicht auf Arrays aufgespottete bekannte Gene zu detektieren.

2.3.2 Praktische Durchführung des „Differential Display of mRNA“

2.3.2.1 DNase-Verdau

Je 25 μg RNA wurden mit 50 Einheiten RNase-freier DNase (RQ1-DNase) für 30 min bei 37 °C im Wasserbad verdaut (20 μl 10 x DNase-Puffer, 25 μg RNA, 1 μl RNasin [40 U/ μl], 5 μl RQ1-DNase (10 U/ μl), mit DEPC-Aqua dest. auf 200 μl auffüllen). Nach Beendigung des Verdaus erfolgte eine Äthanol-fällung mit 30 μl 2 M Natriumazetat pH = 5,4 und 500 μl Äthanol. Durch einstündige Inkubation bei -20 °C wurde die RNA gefällt. Es folgte eine Zentrifugation von 15 min bei 14 000 rpm und 4 °C. Das entstandene Pellet wurde zweimal mit 75 %igem Alkohol gewaschen. Anschließend wurde das RNA-Pellet luftgetrocknet und in 50 μl DEPC-Aqua dest. resuspendiert. Um eventuell zurückgebliebene DNase-Moleküle zu inaktivieren, erfolgte eine 5-minütige Inkubation der RNA-Lösung im Thermoblock bei 90 °C. Anschließend wurde das Eppendorf-Reaktionsgefäß auf Eis gestellt. Das Kondenswasser wurde nach dem Abkühlen kurz abzentrifugiert. Die RNA wurde in einem 1 %igen MOPS-Agarosegel (siehe Pkt. 2.7.1) auf Degradation überprüft. Durch Zugabe von 47,5 μl DEPC-behandeltem Aqua dest. wurde die RNA auf etwa 250 ng/ μl verdünnt. Die Aufbewahrung der DNase-verdauten RNAs erfolgte bei -80 °C.

10 x DNase – Puffer (für RQ1-DNase)
400 mM Tris-Cl, pH = 7,4
100 mM NaCl
60 mM MgCl ₂
1 mM CaCl ₂

2.3.2.2 Die RT-PCR des „Differential Display of mRNA“

2.3.2.2.1 Reverse Transkription

Die reverse Transkription wurde in einem Volumen von 50 µl durchgeführt. DEPC-behandeltes Aqua dest., die zu untersuchende DNase-verdaute RNA und einer der neun Poly(I)-Primer wurden separat zusammenpipettiert (Teil A des reversen Transkriptionsansatzes) und 5 min bei 70 °C im Thermoblock inkubiert. Danach wurde das 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß auf Eiswasser gestellt. Anschließend wurden die als Teil B des reversen Transkriptionsansatzes bezeichneten Komponenten zu Teil A dazupipettiert. Teil B wurde als Mastermix für die im „Differential Display of mRNA“ zu vergleichenden RNA-Proben angesetzt. Der Gesamtansatz der reversen Transkription aus dem im Eppendorf-Reaktionsgefäß vorgelegten Teil A und dem dazupipettierten Teil B wurde nach Vereinigung der beiden Teile gemischt und anschließend kurz zentrifugiert. Es folgte eine einstündige Inkubation bei 37 °C im Wasserbad. Die Inaktivierung der reversen Transkriptase wurde bei 95 °C für 5 min im Thermoblock durchgeführt. Um falsch positive Ergebnisse im „Differential Display of mRNA“ zu reduzieren, wurden die zu vergleichenden RNAs je reversem Primer zweimal unabhängig voneinander revers transkribiert. Die Lagerung des RT-Ansatzes war über mehrere Monate bei -80 °C sehr gut möglich.

Teil A und Teil B für einen 50 µl-RT-Reaktionsansatz (Mastermix für Vergleichsproben!)

Teil A)	20 µl DEPC – Aqua dest.	Denaturierung 5 min bei 70 °C, (Thermoblock) -> Eiswasser -> kurze Zentrifugation, Teil B dazu, mischen, Inkubation für 1 h bei 37 °C Enzyminaktivierung 5 min bei 95 °C
	5 µl RNA (250 ng/µl), (DNase-verdaut)	
	5 µl T ₁₂ VV Primer (Stammlsg. 25 µM)	

Teil B)	10 µl DEPC – Aqua dest
	10 µl 5 x RT – Puffer
	5 µl 0,1 M DTT
	3,75 µl Reverse Transkriptase (M-MVL) (200 U/µl)
	0,5 µl RNasin (40 U/µl)
	1,2 µl dNTP (2,5 mM each)

Primer für “Differential Display of mRNA”:

Reverse Primer	Synthese: Interactiva, Ulm, Deutschland	
T ₁₂ AA	TTT TTT TTT TTT AA	Bauer <i>et al.</i> (1993)
T ₁₂ AC	TTT TTT TTT TTT AC	Bauer <i>et al.</i> (1993)
T ₁₂ AG	TTT TTT TTT TTT AG	Bauer <i>et al.</i> (1993)
T ₁₂ CA	TTT TTT TTT TTT CA	Bauer <i>et al.</i> (1993)
T ₁₂ CC	TTT TTT TTT TTT CC	Bauer <i>et al.</i> (1993)
T ₁₂ CG	TTT TTT TTT TTT CG	Bauer <i>et al.</i> (1993)
T ₁₂ GA	TTT TTT TTT TTT GA	Bauer <i>et al.</i> (1993)
T ₁₂ GC	TTT TTT TTT TTT GC	Bauer <i>et al.</i> (1993)
T ₁₂ GG	TTT TTT TTT TTT GG	Bauer <i>et al.</i> (1993)

2.3.2.2.2 PCR

Der PCR-Mastermix wurde, wie unten angegeben, zusammenpipettiert und auf Eis gestellt aufbewahrt. Je 2 µl des zu untersuchenden RT-Ansatzes jeder Vergleichsprobe wurden in PCR-Reaktionsgefäßen vorgelegt. Der PCR-Reaktionsgefäßständer wurde vor Benutzung bei -20 °C vorgekühlt und während der praktischen Arbeit auf Eis gestellt. Je 18 µl des PCR-Mastermixes wurden in jedes PCR-Reaktionsgefäß zur vorgelegten Vergleichsprobe gegeben und mit einem Tropfen PCR-Mineralöl überschichtet. Die PCR-Reaktionsgefäße wurden nach Erreichen von 94 °C in den Block des PCR-Gerätes eingesetzt. Die PCR erfolgte mit dem unten aufgeführten PCR-Programm. Nach der PCR erfolgte eine vorläufige Lagerung der PCR-Reaktionsgefäße auf Eis. Je 10 µl der PCR-Proben wurden entnommen und in ein vorher vorbereitetes Reaktionsgefäß mit 10 µl PAA-Gel-Lade-Puffer pipettiert. Dadurch kam es zum endgültigen, temperaturunabhängigen Abstoppen der PCR-Reaktion.

PCR- Ansatz (für Vergleichsproben als Mastermix!)	
- PCR-Ansatz mit 4 µM dNTP (each) Endkonzentration im Reaktionsansatz - Optimierung für Thermoprime (+) -Taq-Polymerase	
10,9 µl	DEPC – Aqua dest.
2 µl	10 x PCR-Puffer
0,2 µl	Thermoprime (+) -Taq-Polymerase (5 U/µl)
0,8 µl	dNTP (100 µM each dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
2 µl	T ₁₂ Primer (25 µM)
0,8 µl	Forward-Primer (10 µM)
0,1 µl	α ³² P-dATP (> 3000 Ci/mmol)
1,2 µl	MgCl ₂ (25 mM)
-----	-----
2 µl	RT-Ansatz (wird vorgelegt, alles andere wird als Mastermix angesetzt)

Forward-Primer	Synthese: Interactiva, Ulm, Deutschland	
OPA 2	TGG ATT GGT C	Bauer <i>et al.</i> (1993)
OPA 3	CTT TCT ACC C	Bauer <i>et al.</i> (1993)
OPA 7	TCG ATA CAG G	Bauer <i>et al.</i> (1993)
OPA 9	TCG GTC ATA G	Bauer <i>et al.</i> (1993)
OPA 10	GGT ACT AAG G	Bauer <i>et al.</i> (1993)
OPA 11	TAC CTA AGC G	Bauer <i>et al.</i> (1993)
OPA 12	CTG CTT GAT G	Bauer <i>et al.</i> (1993)
OPA 14	GAT CAA GTC C	Bauer <i>et al.</i> (1993)
AP-1	AGC CAG CGA A	Nees 1997
AP-2	GAC CGC TTG T	Nees 1997
AP-3	AGG TGA ACC G	Nees 1997
AP-4	GGT ACT CCA C	Nees 1997
AP-5	GTT ACT CCA C	Nees 1997
AP-6	GCA ATC GAT G	Nees 1997
AP-7	CCG AAG GAA T	Nees 1997
AP-8	GAA ACG GGT G	Nees 1997
AP-9	GGG TAA CGC C	Nees 1997
AP-10	GTG ATC GCA G	Nees 1997

PCR – Programm (Perkin Elmer PCR-Gerät)

3 min	94 °C	1 x
15 s	94 °C	
2 min	38 °C bzw. 40 °C	30 x
30 s	72 °C	
7 min	72 °C	1 x
∞	4 °C	1 x

2.3.2.3 Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte, denaturierende PAA-Gele

Die gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte wurde mit einer konventionellen Sequenziergelvorrichtung 20 x 60 cm durchgeführt. Die Spacerdicke betrug 0,4 mm. Die Reinigung der Sequenziergelelektrophoreseplatten erfolgte mit SDS und warmem Wasser, anschließender Behandlung mit Aqua dest. (1x), Azeton (2x) sowie Alkohol (1x). Die Glasplatten und Spacer wurden zusammengesetzt und die rechte, die untere und die linke Kante der Gelvorrichtung mit Klebeband abgedichtet. Das Gel wurde anschließend ebenfalls rechts, unten und links abgeklammert.

Die bei 4 °C gekühlte 6 %ige Polyacrylamid/7 M Harnstoff-Gellösung wurde durch Filtration durch einen 45 µm-Filter von kristallinen Bestandteilen befreit. 1/200 10 %iges APS sowie 1/2000 TEMED wurden zur Gellösung gegeben. Das Gel wurde gegossen und der 32-Taschen-Gelkamm eingesetzt. Die Gelvorrichtung wurde anschließend auch oben abgeklammert. Es folgte eine einstündige Ruhephase, in der das Gel vollständig auspolymerisierte. Die Klammern oben und unten sowie die Abklebungen an allen vier Seiten wurden entfernt. Das Gel wurde in die Gelelektrophoresevorrichtung gespannt. In den unteren und in den oberen Puffertank wurden je 500 ml TBE-Puffer für PAA-Gele gefüllt. Der Kamm wurde vorsichtig gezogen. Nach Verbinden aller elektrischen Leitungen erfolgte ein einstündiger Gelvorlauf bei konstanter Spannung (2,5 kV). Kurz vor Beenden des Gelvorlaufs wurden die PCR-Proben (10 µl des PCR-Ansatzes + 10 µl Ladepuffer) bei 95 °C im Thermoblock denaturiert, auf Eiswasser abgeschreckt und anschließend abzentrifugiert. Nach Beenden des Vorlaufs wurden die Geltaschen mit Laufpuffer aus dem oberen Puffertank ausgespült. Dadurch wurde der sich in den Taschen angesammelte positiv geladene Harnstoff entfernt, der ansonsten das Beladen des Gels mit den zu untersuchenden PCR-Proben unmöglich machte.

Anschließend wurden je 1,5 µl jeder Vergleichsprobe nebeneinander auf das Gel aufgetragen. Die Gelelektrophorese wurde erneut gestartet und nach Erreichen des zweiten Geldrittels durch den Bromphenolblaumarker beendet. Die Gelelektrophoresevorrichtung wurde abgebaut. Das Gel haftete nach Öffnen der beiden Glasplatten meist vollständig an der einen oder anderen Glasplatte. Es konnte dann mit Whatmann-Filterpapier abgezogen werden. Das abgezogene Gel wurde mit Haushaltfolie abgedeckt und auf dem Geltrockner bei 80 °C unter Vakuum für 90 min getrocknet. Das getrocknete Gel auf dem Whatmann-Filterpapier wurde trapezförmig zerschnitten. Die Schnittlinien waren nach Exposition auf Röntgenfilm (Hyperfilm β-max) auf der Autoradiografie gut erkennbar und dienten der Orientierung bei der Isolation der cDNA aus dem Gel. Nach Auflegen eines Röntgenfilmes erfolgte die Exposition über Nacht bei Raumtemperatur.

6 % PAA/ 7 M Harnstoff
28,5 g Acrylamid
1,5 g N,N-Dimethyl-Bisacrylamid
210 g Harnstoff
50 ml 10 x TBE – Puffer für PAA Gele
Auf 500 ml mit Aqua dest. auffüllen.

2 x Ladepuffer für PAA-Gele
98 % deionisiertes Formamid
10 mM EDTA, pH= 8,0
0,02 % Xylencyanol
0,02% Bromphenolblau

10 x TBE Lauf-Puffer für PAA-Gele
108 g Tris (Base)
55 g Borsäure
9,5 g EDTA
auf 1 l mit Aqua dest. auffüllen, keinen pH-Wert einstellen!

2.3.2.4 Ausschneiden der interessanten cDNA-Banden

Nach Auswertung der Autoradiogramme und dem Festlegen der interessanten PCR-Banden, die differentiell exprimierte Gene darstellen, mussten die weiter zu bearbeitenden cDNAs aus dem getrockneten Gel isoliert werden. Dafür wurde der entwickelte Röntgenfilm mit Hilfe der trapezförmigen Schnittlinien deckungsgleich auf das getrocknete Gel gelegt und mit Büroklammern fixiert. Vorsichtig wurde anschließend Kohlepapier zwischen Röntgenfilm und Gel geschoben. Die zum Ausschneiden vorgesehene PCR-Bande wurde auf das Gel durchgepaust. Die markierte cDNA-Bande wurde mit einem neuen Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Das ausgeschnittene Gelstückchen wurde in ein PCR-Reaktionsgefäß überführt. 50 µl Aqua dest. wurden zugefügt. Die PCR-Reaktionsgefäße mit den ausgeschnittenen Gelstückchen wurden 5 min bei 99 °C im PCR-Block inkubiert und auf Eiswasser gestellt. Anschließend wurde die flüssige Fraktion mit der nun in Wasser gelösten cDNA in ein neues PCR-Reaktionsgefäß überführt.

2.3.2.5 Reamplifikation der cDNAs

Die Reamplifikation wurde bei einer im Vergleich zur „Differential Display of mRNA“-Reaktion höheren dNTP-Endkonzentration von 40 µM (each dNTP) durchgeführt. Die restlichen PCR-Bedingungen wurden vom „Differential Display of mRNA“-PCR-Protokoll übernommen (Pkt. 2.3.2.2.2).

Das reamplifizierte PCR-Produkt wurde in einem 1 %igen TBE-Agarosegel erneut aufgetrennt. Die meist singuläre und im Agarosegel allein sichtbare DNA-Hauptbande wurde mit einem sterilen, fabrikneuen Skalpell ausgeschnitten. Die cDNA wurde mit dem Qiagen-Gelextraktionskit (siehe Pkt. 2.3.2.6) aus dem Agarose-Stück aufgereinigt und durch eine Äthanol-fällung und anschließende Aufnahme in 15 µl Aqua dest. aufkonzentriert. 2 µl wurden erneut in einem 1 %igem TBE-Agarosegel zur Konzentrationsbestimmung aufgetrennt. Als Konzentrationsstandard wurden 500 ng Lambda HindIII verwendet. Je 5 – 20 ng DNA wurden anschließend für die Klonierungsreaktion eingesetzt.

<u>TBE – Puffer für Agarose-Gele</u>
108 g TRIS
55g Borsäure
9,5 g EDTA
Auf 1 l mit Aqua dest auffüllen, pH-Wert auf 7,8 einstellen

2.3.2.6 Aufreinigung des PCR Produktes mit „QIAquick™ Gel Extraction Kit“

Nach Ausschneiden des DNA-enthaltenden Agarosestückchens aus dem Agarosegel wurde dieses in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß (1,5 ml bzw. 2,0 ml) überführt und mit dem „QIAquick™ Gel Extraction Kit“ (Qiagen, Hilden, Deutschland, Katalog-Nr.: 28706) aus dem Agarosegel entsprechend der Anleitung (Stand: April 2000) aufgereinigt.

2.3.2.7 Klonierung der mit dem „Differential Display of mRNA“ identifizierten cDNAs

Für eine schnelle und effiziente Klonierung der reamplifizierten cDNAs wurde das „TOPO-TA Cloning®-Kit“ der Firma Invitrogen ausgewählt (INVITROGEN, Carlsbad, USA, Katalog-Nr.: K 4600-40). Die TA-Klonierung erfolgte gemäß dem Handbuch. Es wurde eine Blau-Weiß-Selektion durchgeführt. Je 10 weiße Kolonien wurden gepickt und weiter verarbeitet.

2.3.2.8 Heterogenitätsanalyse der klonierten „Differential Display of mRNA“-cDNAs

2.3.2.8.1 Allgemeines zur Heterogenitätsanalyse

Wie in Pkt. 2.3.2.7 dargelegt, wurden 10 weiße Kolonien je reamplifizierter und klonierter cDNA gepickt. Optimal für die Verifizierung der „Differential Display of mRNA“-Ergebnisse wäre es gewesen, wenn alle 10 Kolonien das gleiche Insert enthalten hätten. Nur eine Bakterienkolonie je klonierter cDNA hätte weiter bearbeitet werden müssen. Theoretisch hätte sie die cDNA enthalten, die die PCR-Bande im „Differential Display of mRNA“-Gel erzeugt.

Praktisch zeigte es sich jedoch, dass die 10 Klone bis zu 6 verschiedene Inserts enthalten konnten. Die Inserts waren von der Länge oft identisch. Nur durch teures und aufwändiges Sequenzieren hätten sie voneinander unterschieden werden können. Um die Zahl der weiter bearbeiteten Klone einzuschränken, wurde für diese Arbeit ein einfaches, aber sehr effizientes und relativ schnell durchführbares Klonheterogenitätsanalyseverfahren entwickelt.

Die gepickten 10 weißen Bakterienkolonien wurden von der Petrischale in 5 ml Ampizillin-haltiges LB-Medium überimpft. Die Kultivierung der 5 ml-Kulturen erfolgte über Nacht auf dem Horizontalschüttler in 15 ml Falcon-Reaktionsgefäßen. 4 ml Bakterienkultur wurden durch zweimaliges Zentrifugieren bei 14 000 rpm und anschließendes Verwerfen des Überstandes pelletiert. Die pelletierten Bakterien wurden für mindestens 20 min bei -20 °C eingefroren. Der letzte Milliliter Bakterienkultur verblieb im Falcon-Reaktionsgefäß. Dieses wurde fest zugedreht und im 4 °C-Kühlraum bis zum Abschluss der Klonheterogenitätsanalyse aufbewahrt. Aus den eingefrorenen Bakterienpellets wurde nach der konventionellen Methode für die Plasmid-Isolation im Minimaßstab nach Birnboim und Doly (1979) Plasmid-DNA isoliert (siehe Pkt.

2.3.2.8.2). Die Plasmid-DNA aller 10 Klone einer Klonierungsrunde wurde mit Eco R1 verdaut und im 1 %igen TBE-Agarose-Gel aufgetrennt. Es wurde ein Southern-Blot durchgeführt. Die Klonheterogenität wurde mit einem verkürzten Hybridisierungsprotokoll bestimmt (Pkt. 2.3.2.8.5). Nach Abschluss der Heterogenitätsanalyse wurden für jede cDNA-Spezies innerhalb der 10 untersuchten Klone eine Glycerinkultur angelegt (Pkt. 2.3.2.8.6). Die Protokolle für die Heterogenitätsanalyse sind in den nächsten vier Gliederungspunkten aufgeführt.

2.3.2.8.2 Konventionelle Isolierung von Plasmid-DNA im Minimaßstab (Minipräp)

Für die Aufarbeitung der Plasmid-DNAs mit den zu untersuchenden cDNAs wurde die Methode nach Birnboim und Doly (1979) eingesetzt (Ausführliches Protokoll: Ausubel 1991). Sie stellt die konventionelle Methode zur Minipräp-Plasmid-Isolation aus Bakterien dar und ist im Vergleich zu heute kommerziell verfügbaren Minipräpsystemen billig. Vorbereitend wurden 5 ml LB-Medium in einem 15 ml Falcon-Reaktionsgefäß mit einer einzelnen Bakterienkolonie von der Petrischale beimpft. Es folgte eine Inkubation über Nacht bei 37 °C auf dem Horizontalschüttler. Die Bakterien aus 4 ml wurden sukzessive in einem 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß durch Zentrifugation für 1 min bei 14000 rpm pelletiert und für mindestens 20 Minuten bei -20 °C eingefroren. Dieser Schritt stellte eine Abwandlung vom Originalprotokoll dar. Er führte zu einer besseren Aufschließbarkeit der Bakterien und ermöglichte es, die weiteren Schritte zu einem späteren Zeitpunkt durchzuführen.

2.3.2.8.3 Der Eco-R1-Verdau innerhalb der Heterogenitätsanalyse

Je 5 µl des Minipräps wurden mit EcoR1 in einem Volumen von 20 µl über Nacht bei 37 °C verdaut. Die Zusammensetzung des Verdau ist unten angegeben. Durch diesen Verdau wurde aus dem für die Klonierung verwendeten pCR®II-Vektor das Insert herausgeschnitten. Nach Beendigung des Verdau wurde dem Reaktionsgemisch 4 µl 6 x BPB als Ladepuffer zugegeben.

Die Verdaue der 10 rekrutierten Klone jeder isolierten „Differential Display of mRNA“-Bande wurde nebeneinander auf einem 1 %igen TBE-Puffer-Agarosegel aufgetragen. Bei der Gelelektrophorese wurde das kleinere Insert vom Vektor räumlich getrennt. Hatten Insert und Vektor knapp 2 cm Abstand voneinander, wurde der Gellauf beendet. Die DNA wurde per Southern-Blot (Pkt. 2.3.2.8.4) auf eine Nylonmembran übertragen.

<u>Eco-R1-Verdau</u>
5 µl Minipräp-DNA
1 µl EcoR1 (20 000U/ml)
2 µl 10 X EcoR1 Puffer
12 µl Aqua dest.

<u>6 x BPB-Puffer (DNA-Ladepuffer für Agarosegele)</u>
50 % Saccharose
20 mM Tris·Cl pH = 7,6
2 mM EDTA
0,02 % Bromphenolblau
0,02 % Xylencyanol

2.3.2.8.4 Southern-Blot

Innerhalb der Heterogenitätsanalyse konnte aufgrund kleiner zu übertragender Fragmente mit einem vereinfachten Protokoll für den Souther-Blot gearbeitet werden. Das Agarosegel wurde nach Beendigung des Gellaufes in 1,5 M NaCl/0,5 N NaOH-Lösung überführt und dreimal je 15 min in jeweils frischer Lösung inkubiert. Der Southern-Blot wurde mittels Vakuumbloit durchgeführt (Pkt. 2.7.2). Nach Beendigung des Transfers (45 min) wurde die Nylonmembran in 1M Tris (pH=7,4)/ 1,5 M NaCl überführt und 10 min in 1M Tris/1,5 M NaCl₂ neutralisiert. Anschließend wurde die Membran für 5 min in 2 x SSC geschwenkt.

1,5 M NaCl/0,5 N NaOH (für 1 l)
87,66 g NaCl
20 g NaOH

1 M Tris (pH = 7,4)/1,5 M NaCl₂ (für 500 ml)
43,83 g NaCl
200 ml 2,5 M Tris·Cl (pH 7,4)

20 x SSC
175,3 g NaCl
88,2 g Na-Zitrat
In 800 ml Aqua dest. lösen
mit kristalliner Zitronensäure pH-Wert auf 7,0 einstellen und auf 1 l mit Aqua dest. auffüllen

2.3.2.8.5 Hybridisierung

Für die Hybridisierung wurden 0,5 µl des Minipräps mit $\alpha^{32}\text{P}$ -dATP nach der Methode von Feinberg und Vogelstein (1983, 1984) mit dem „Random Primed DNA Labeling Kit“ (Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland, Katalog-Nr.: 1004 760) radioaktiv markiert. Als Markierungsprotokoll wurde das unter dem Pkt. 2.7.3.1 aufgeführte Protokoll verwendet. Dieses wurde zeitlich verkürzt und kosteneffizienter gestaltet, indem die Abtrennung der freien Nukleotide weggelassen wurde. Die radioaktiven Signale auf dem Filter waren nach Hybridisierung so stark (~30 min Exposition bei Raumtemperatur), dass auftretende Hintergrundprobleme durch freie Nukleotide vernachlässigbar waren.

Nach Autoradiografie konnte man auf dem Röntgenfilm Hybridisierungssignale des Vektors für alle 10 Klone sowie für die Inserts sehen, die mit dem Insert des Klons, der als Hybridisierungssonde markiert wurde, übereinstimmten (Abb. 2/4). Im Idealfall hatten die Inserts aller Klone hybridisiert. War dies nicht der Fall, wurde der Filter erneut mit dem nächsten, am weitesten links positionierten Klon hybridisiert, der zwar ein Insert besaß, dessen Insert jedoch aufgrund seiner Verschiedenheit zur Hybridisierungssonde kein Hybridisierungssignal auf dem Autoradiogramm hinterließ. Die Hybridisierung wurde so lange fortgesetzt, bis entweder kein Insert ohne Hybridisierung übrigblieb oder nur noch eins, welches logischerweise nicht mit sich selbst hybridisiert werden musste.

Klonheterogenitätsanalyse – Autoradiogramme nach Southern - Hybridisierung

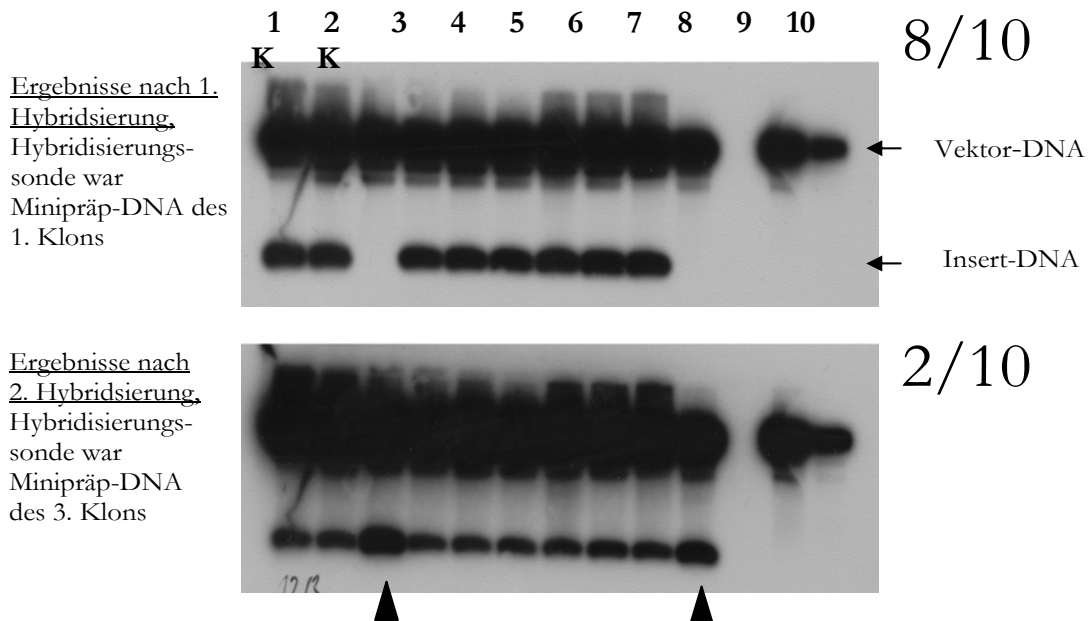


Abb. 2/4

Beispiel für Klonheterogenitätsanalyse. Southern-Blot-Hybridisierungen wurden für den 1. – 10. Klon einer klonierten DD-cDNA-Probe durchgeführt. Kontrollplasmide (K) ebenfalls mit Insert wurden mitgeführt, um die Stringenz der Hybridisierungsbedingungen zu gewährleisten. Für die Kontrollen konnte nur Hybridisierungssignale für die Vektor-DNA auftreten, die Inserts erbrachten kein Signal. Ergebnis der dargestellten Analyse war, dass Klon 3 und 10 identische Inserts enthielten, ebenso waren die Klone 1 und 2 sowie 4 - 9 identisch.

2.3.2.8.6 Stammhaltung-Glyzerinkulturen

Nach Bestimmung der Klonheterogenität wurde für jede als individuell charakterisierte „Differential Display of mRNA“-cDNA eine Glyzerindauerkultur angelegt. Dafür wurde der Rest von 1 ml Bakterienkultur im 15 ml Reaktionsgefäß verwendet, der zum entsprechenden Insert gehörte. Es wurden 0,85 ml Bakterienkultur in LB-Medium mit 0,15 ml sterilem Glyzerin zusammenpipettiert. Nach Verschluss der Kryoröhrchen wurde die Kultur gevortext, bis sich das Glyzerin gleichmäßig in der Kultur verteilt hatte. Die Kultur wurde für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Glyzerinkultur noch einmal kräftig durchmischt und bei -80°C eingefroren. Bakterien waren so bis zu zwei Jahren überlebensfähig. Durch kurzes Öffnen der Kryoröhrchen und Abstreichen einer kleinen Menge von der Oberfläche mit einer Pipettenspitze, die zum Überimpfen genutzt wurde, konnte jederzeit eine neue LB-Flüssigkultur angelegt werden.

2.4 Detektion differentiell exprimierter Gene mit ATLASTM-cDNA Arrays

2.4.1 Die cDNA-Array-Technologie

Die modernste und effizienteste Methode, Genexpressionsprofile zu erstellen, ist die Hybridisierung von cDNA-Arrays mit den untersuchten mRNA-Proben. Nukleinsäure-Arrays und ihre Anwendungen wurden Mitte der 90er-Jahre erstmals beschrieben (Chalifour et al. 1994, DeRisi et al. 1996, DeRisi et al. 1997, de Saizieu et al. 1998). Für die Untersuchungen in dieser Arbeit wurde der als „ATLASTM Human Cancer 1.2 Array“ bezeichnete ATLASTM-cDNA-Array der Firma Clontech (Clontech Laboratories, Palo Alto, USA, Katalog-Nr.: 7851-1) ausgewählt. Er beinhaltet 1176 auf eine Nylonmembran gespottete menschliche cDNAs. Diese cDNAs wurden in sechs Quadranten aufgetragen, die eine funktionelle Gliederung der Gene darstellen. Auf den cDNA-Arrays der Firma Clontech wurden außerdem Plasmid- und Bakteriophagen-DNAs als Negativkontrollen aufgespottet, um die Hybridisierungsspezifität zu kontrollieren. Verschiedene Housekeeping-Gene wurden aufgetragen, um die mRNA-Expression normalisieren zu können.

2.4.2 Die praktische Durchführung der ATLASTM-cDNA-Array-Hybridisierung

Die ATLASTM-cDNA Filter wurden mit RNA der 4. und 5. Infektion (je 4 Proben: LXS^N, LXS^N+FCS/Ca²⁺, HPV16E6 und HPV16E6+FCS/Ca²⁺) hybridisiert. Die Hybridisierung der ATLASTM-cDNA-Array-Filter sowie das Strippen der alten Proben erfolgten gemäß dem beiliegenden Handbuch (Protokoll-Nr.: PT3140-1, Protokoll-Version-Nr.: PR95837).

2.4.3 Optische Auswertung der ATLASTM-Array-Hybridisierung

Die optische Auswertung stellt eine wichtige, für die weiteren Auswertungsverfahren zehrsparende Methode dar, um Expressionsunterschiede zu detektieren. Je ein Röntgenfilm-Set von vier Filtern (LXS^N, LXS^N+FCS/Ca²⁺, HPV16E6, HPV16E6+FCS/Ca²⁺) für die 4. und 5. Infektion sowie für die unterschiedlich langen Expositionszeiten wurden miteinander verglichen. Das Detektionsverfahren war auf das Auffinden differenzierungsabhängiger und durch HPV16E6 veränderter Expressionsmuster ausgelegt. Die Unterschiede sollten möglichst konsistent sein, das heißt in den Infektionen vier und fünf gleich bzw. ähnlich auftreten. Die Unterschiede wurden tabellarisch zusammengestellt.

2.4.4 Auswertung der Expressionsmuster mit der Clontech-Software ATLASImageTM 1.0

Die durch die optische Auswertung vorselektierten Expressionsunterschiede von Genen wurden durch die für die ATLASTM-cDNA-Arrays entwickelte Software ATLASImageTM-1.0 (CLONTECH Laboratories, Palo Alto, USA, Katalog-Nr.: V1210-1) nach deren Erwerb semiquantitativ ausgewertet. Für die Vermessung wurden eingescannte Röntgenfilme für die unterschiedlichen Expositionszeiten benutzt. Mit Phosphorimagerdateien konnte nicht gearbeitet werden, da die Datenformate der Clontech-Software und die Phosphorimagerdateien nicht kompatibel waren. Die Expressionsunterschiede wurden gemäß dem Handbuch (Protokoll-Nr. 3381-1, Protokoll-Version PR97254) vermessen und berechnet. Der Abgleich wurde gegen das

Housekeeping-Gen β -Aktin vorgenommen. Die durch die Semiquantifizierung der Hybridisierungssignale erhaltenen Ergebnisse wurden in Blockdiagrammen dargestellt und mit den Ergebnissen der optischen Auswertung verglichen. Mit Hilfe der Software ATLASImageTM 1.0 wurde auch die sekundäre Auswertung der ATLASTM-cDNA-Arrays vorgenommen.

2.4.5 Klonierung der interessanten cDNAs des ATLASTM-Filters in Vektoren

2.4.5.1 Allgemeines zur Klonierung der ATLASTM-cDNAs

Neun interessante cDNAs wurden anfangs durch die optische und densitometrische Auswertung der ATLASTM-cDNA-Array-Filter detektiert. Für weitere Arbeiten mussten die cDNAs kloniert werden. Für diesen Zweck wurden die unter Pkt. 2.4.5.2.2 aufgeführten Sequenzinformationen von der Firma Clontech angefordert.

RNA der Zelllinien HPK1A früh ($p = 83$) und HPK1A spät ($p = 376$) (Dürst *et al.* 1987) wurde nach dem im Pkt. 2.3.2.1 aufgeführten Protokoll DNase-verdaut, revers transkribiert und anschließend in einer PCR eingesetzt. Für jedes Gen mit seinen spezifischen Primern musste die PCR so optimiert werden, dass eine singuläre Bande der von Clontech angegebenen Größe für mindestens eine HPK1A-RNA zu detektieren war. Die DNA-PCR-Produkt-Bande wurde mit einem neuen Einmalskalpell aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem Qiagen-Gel-Extraktionskit extrahiert (Pkt. 2.3.2.6). Die Klonierung erfolgte in den pCR®-II-Vektor von Invitrogen und verlief analog der Klonierung der „Differential Display of mRNA“-Klone (Pkt. 2.3.2.7). Auch für die klonierten ATLASTM-cDNAs wurden die im Pkt. 2.3.2.8 beschriebenen Klonheterogenitätsanalysen durchgeführt. Es zeigte sich, dass die durchgeführten PCRs sehr spezifisch waren. Bei acht von neun klonierten ATLASTM-cDNAs waren alle Insert-enthaltenden Klone identisch. In einem Fall wurden zwei verschiedene Inserts detektiert. Je ein Klon wurde als Glycerindauerkultur (Pkt. 2.3.2.8.6) angelegt und zur Kontrolle sequenziert.

2.4.5.2 RT-PCR für die Klonierung der ATLASTM-cDNAs

2.4.5.2.1 Reverse Transkription

Für die Klonierung der ATLASTM-Array-cDNAs wurde die RNA aus einer frühen und späten Passage der HPK1A-Zelllinie (Dürst *et al.* 1987) verwendet. Es wurden RNAs sowohl der frühen ($p = 83$) als auch der späten ($p = 376$) Passage für den Fall verwendet, dass die benötigte mRNA in der einen oder anderen Probe nicht oder nur gering exprimiert wurde. Die RNAs der frühen und späten Passagen der HPK1A-Zelllinie wurden wie unter Pkt. 2.3.2.1 beschrieben DNase-verdaut.

Die reverse Transkription für die RT-PCR der ATLASTM-cDNAs wurde analog dem Protokoll der reversen Transkription für die ATLASTM-Array-Hybridisierungsproben-Markierung in Pkt. 2.4.2 durchgeführt. Die reverse Transkription erfolgte hier jedoch nicht radioaktiv. Anstelle des radioaktiven Nukleotids wurde DEPC-behandeltes Aqua dest. in den Mastermix pipettiert. Der eingesetzte dNTP-Mix bestand aus allen vier Nukleotiden. Die Nukleotide dATPⁱ, dCTP, dGTP und dTTP lagen in einer Konzentration von 5 mM each vor. Als Primer für die reverse

Transkription wurde ein Oligo(dT)-Primer des Smart-Kits der Firma Clontech verwendet (Katalog-Nr.: K1052-1), der nachsynthetisiert wurde und dessen Sequenz unten aufgeführt ist.

Die RNA wurde für beide RNAs in zwei PCR-Reaktionsgefäßen vorgelegt. 1 µl CDS-Primer (10 µM) wurde zu der RNA pipettiert. Das Volumen wurde mit DEPC-behandeltem Aqua dest. auf 3 µl aufgefüllt. Dann wurde der Mastermix für die reverse Transkription der zwei Proben für 10 min bei 70 °C im PCR-Gerät inkubiert und weitere 4 min bei 48 °C. Nach Ablauf der ersten 2 min bei 48 °C wurde der RT-Mastermix ebenfalls bei 48 °C inkubiert und vorgewärmt. Je 8 µl des Mastermixes wurden dem RNA-Primer-Gemisch zugegeben und durch Auf- und Abpipettieren vorsichtig gemischt. Die Reaktionsgefäße wurden für weitere 45 min bei 48 °C inkubiert. Das Reaktionsgefäß wurde dann auf Eis gestellt und der Inhalt mit 40 µl DEPC-behandeltem Aqua dest. aufgefüllt und gemischt. Der RT-Ansatz wurde bis zur späteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

RT-Mastermix	1 x	2 x
5 x Reaktionspuffer (der reversen Transkriptase beiliegend)	2 µl	4 µl
10 x dNTP (Stammlsg.: 5 mM each)	1 µl	2 µl
DTT (100 mM) (der reversen Transkriptase beiliegend)	0,5 µl	1 µl
DEPC-behandeltes Aqua dest.	3,5 µl	7 µl
SUPERScript™ II Reverse Transkriptase (200 U/µl)	1 µl	2 µl
	-----	-----
	8 µl	16 µl

RNA-Probe und Primer	
RNA (1µg/µl) (DNase-verdaut)	2 µl
CDS Primer (10 µM)	1 µl

	3 µl

Sequenz des CDS-Primers aus Smart-Kit (Clontech)
5' AAG CAG TGG TAA CAA CGC AGA GTA CT ₍₃₀₎ VN – 3'
(N=A,C,G oder T, V = A,G oder C)

2.4.5.2.2 PCR

Primer Sequenzdaten der cDNAs

<u>ATLAS-Koordinaten:</u>	A07d
<u>Gen-Bank Accession Nummer:</u>	M76125
<u>Name:</u>	Vorläufer des Tyrosin-Protein Kinase Rezeptor UFO, AXL - Onkogen
<u>Länge des amplifizierten Fragmentes:</u>	274 bp

<u>Primer-Bezeichnung</u>	<u>Primer-Sequenzen</u>	<u>Primer-Lokalisation in der unter Accession-Nummer angegebenen Sequenz</u>	<u>Primer-Länge</u>
Oligo 829	5'-agt gta cct gcc cac tca gat gct agt gaa- 3'	2054-2084	30 b
Oligo 830	5'- cac atc gct ctt gct ggt gta gac acg gt – 3'	2328-2299	29 b

<u>ATLAS-Koordinaten:</u>	<i>A09l</i>
<u>Gen-Bank Accession Nummer:</u>	U09579, L25610
<u>Name:</u>	Cyclin-abhängige Kinase Inhibitor 1, p21, WAF1
<u>Länge des amplifizierten Fragmentes:</u>	318 bp

<u>Primer-Bezeichnung</u>	<u>Primer-Sequenzen</u>	<u>Primer-Lokalisation in der unter Accession-Nummer angegebenen Sequenz</u>	<u>Primer-Länge</u>
Oligo 1631	5'- att agc agc gga aca agg agt cag aca t - 3'	1745 - 1773	28 b
Oligo 1632	5'- ctg tga aag aca cag aac agt aca gg t - 3'	2063 - 2035	28 b

<u>ATLAS-Koordinaten:</u>	<i>A14a</i>
<u>Gen-Bank Accession Nummer:</u>	Z13009
<u>Name:</u>	Cadherin 1 (CDH1), Vorläufer des epithelialen Cadherins (E-Cadherin)
<u>Länge des amplifizierten Fragmentes:</u>	270 bp

<u>Primer-Bezeichnung</u>	<u>Primer-Sequenzen</u>	<u>Primer-Lokalisation in der unter Accession-Nummer angegebenen Sequenz</u>	<u>Primer-Länge</u>
[C215]-375	5'- atc ctc cga tct tca atc cca cca c - 3'	1206 - 1231	25 b
[C215]-376	5'- gta cca cat tcg tca ctg cta cgt g - 3'	1476 - 1451	25 b

<u>ATLAS-Koordinaten:</u>	<i>B07l</i>
<u>Gen-Bank Accession Nummer:</u>	M80563
<u>Name:</u>	Plazentales Kalzium-bindendes Protein, Calvasculin, S100 Kalzium-bindendes Protein A4, MTS1 Protein
<u>Länge des amplifizierten Fragmentes:</u>	190 bp

<u>Primer-Bezeichnung</u>	<u>Primer-Sequenzen</u>	<u>Primer-Lokalisation in der unter Accession-Nummer angegebenen Sequenz</u>	<u>Primer-Länge</u>
[CA173]-503	5'- gaa ggc cct gga tgt gat ggt gtc - 3'	153 - 176	24 b
[CA173]-504	5'- cct cgt tgt ccc tgt tgc tgt cc - 3'	343 - 321	23 b

<u>ATLAS-Koordinaten:</u>	<i>B08b</i>
<u>Gen-Bank Accession Nummer:</u>	U48296
<u>Name:</u>	PTPCAAX1 nukleäres Tyrosin Phosphatase (PRL-1)
<u>Länge des amplifizierten Fragmentes:</u>	211 bp

<u>Primer-Bezeichnung</u>	<u>Primer-Sequenzen</u>	<u>Primer-Lokalisation in der unter Accession-Nummer angegebenen Sequenz</u>	<u>Primer-Länge</u>
[CA257]-369	5'- cct ggt tgt tgt att gct gtt cat tgc - 3'	678 - 704	27 b
[CA257]-370	5'- tga ccg ttg gaa tct ttg aaa cgc ag - 3'	889 - 864	26 b

<u>ATLAS-Koordinaten:</u>	<i>B11j</i>
<u>Gen-Bank Accession Nummer:</u>	D85815
<u>Name:</u>	RhoHP1
<u>Länge des amplifizierten Fragmentes:</u>	231 bp

<u>Primer-Bezeichnung</u>	<u>Primer-Sequenzen</u>	<u>Primer-Lokalisation in der unter Accession-Nummer angegebenen Sequenz</u>	<u>Primer-Länge</u>
[C235]-449	5`- acg tcg ctg ctg atg gtc ttc gcc - 3`	130- 154	24 b
[C235]-450	5`- gat gtt gtc aaa gct gtt cgg gct g - 3`	361 - 336	25 b

<u>ATLAS-Koordinaten:</u>	<i>C13k</i>
<u>Gen-Bank Accession Nummer:</u>	AF027292
<u>Name:</u>	Interferon Regulatorischer Faktor 6 (IRF 6)
<u>Länge des amplifizierten Fragmentes:</u>	271 bp

<u>Primer-Bezeichnung</u>	<u>Primer-Sequenzen</u>	<u>Primer-Lokalisation in der unter Accession-Nummer angegebenen Sequenz</u>	<u>Primer-Länge</u>
[CA040]-63	5`- cca tca ggc tgt gcc agt gca ag - 3`	1006 – 1028	23 b
[CA040]-64	5`- gta gat cat ccg agc cac tac tgg - 3`	1277 - 1254	24 b

<u>ATLAS-Koordinaten:</u>	<i>F09h</i>
<u>Gen-Bank Accession Nummer:</u>	X63679
<u>Name:</u>	TRAM-Protein
<u>Länge des amplifizierten Fragmentes:</u>	320 bp

<u>Primer-Bezeichnung</u>	<u>Primer-Sequenzen</u>	<u>Primer-Lokalisation in der unter Accession- Nummer angegebenen Sequenz</u>	<u>Primer-Länge</u>
[CA332]-591	5`- ttg tta ctc ttc agt aca atg tca ccc - 3`	270 - 296	27 b
[CA332]-592	5`- gat aag ccc tcc ata aga tag ttg gg - 3`	590 - 565	26 b

<u>ATLAS-Koordinaten:</u>	<i>F12f</i>
<u>Gen-Bank Accession Nummer</u>	M99061, S43646
<u>Name:</u>	Typ II zytoskellitäres 2 Epidermales Keratin (KRT2E), Zytokeratin 2E
<u>Länge des amplifizierten Fragmentes:</u>	341 bp

<u>Primer-Bezeichnung</u>	<u>Primer-Sequenzen</u>	<u>Primer-Lokalisation in der unter Accession -Nummer angegebenen Sequenz</u>	<u>Primer-Länge</u>
Oligo 1523	5`- ccg agg tca agg ccc agt atg agg - 3`	1100 – 1124	24 b
Oligi 1524	5`- gta gtc acg cag cag ccg cgc caa - 3`	1441 - 1417	24 b

Die PCR – Bedingungen für die Amplifizierung der ATLAS™-cDNAs

Die für die Amplifizierung der ATLAS™-cDNAs angegebenen Primer wurden von der Firma Interactiva (Ulm, Deutschland) synthetisiert. Anhand der durch das Qualitätszertifikat genannten Schmelztemperaturen wurden die PCR-Programme für die Amplifikation optimiert. Die PCR-Produkte wurden ebenfalls wie in Pkt. 2.3.2.7 beschrieben in den pCR®II-Vektor der Firma Invitrogen kloniert. Der allgemeine PCR-Ansatz wurde wie unten aufgeführt auf Eis zusammenpipettiert.

PCR-Ansatz	
2,5 µl	cDNA
5 µl	PCR-Primer 1 (15 pmol/µl)
5 µl	PCR-Primer 2 (15 pmol/µl)
1 µl	dNTP (10mM each)
3 µl	MgCl ₂ (25 mM)
0,5 ml	Thermoprime (+) -Taq-Polymerase
5 µl	10 x Puffer
28 µl	Aqua dest.

PCR- Programm * für die cDNAs <i>A07d</i>, <i>F12f</i> und <i>B07l</i>		
1 X	2 min 45 s	94 °C
40 X	30 s	94 °C
	30 s	55 °C
	30 s	72 °C
1 X	7 min	72 °C
	∞	4 °C

PCR-Programm * für die cDNAs <i>A14 a</i>, <i>B08h</i>, <i>F09h</i> und <i>C13k</i> („touch down“ PCR)		
1 X	2 min 45 s	94 °C
5 X	30s	94 °C
	30s	60°C bzw. 58, 56, 54, 52 °C
	30s	72 °C
35 X	30 s	94 °C
	30 s	50 °C
	30 s	72 °C
1 X	7 min	72 °C
	∞	4 °C

PCR-Programm * für die cDNA <i>A09l</i>		
1 X	2 min 45 s	94 °C
40 X	30 s	94 °C
	30 s	50 °C
	30 s	72 °C
1 X	7 min	72 °C
	∞	4 °C

PCR – Programm * für die cDNA <i>B11j</i> („touch down“ PCR)		
1 X	2 min 45 s	94 °C
5 X	30s	94 °C
	30s	68°C bzw. 66,64,62,60 °C
	30s	72 °C
35 X	30 s	94 °C
	30 s	58 °C
	30 s	72 °C
1 X	7 min	72 °C
	∞	4 °C

* Eppendorf-Cycler Master-Gradient (Eppendorf, Deutschland)

2.5 Die primäre Verifikation durch Reverse-Northern-Blot-Hybridisierung

2.5.1 Forderungen an die Verifikation der differentiellen Genexpression

Zur Verifikation der „Differential Display of mRNA“- und der ATLASTM-cDNA-Array-Ergebnisse war es notwendig, ein molekularbiologisches Screeningverfahren zu entwickeln, welches es ermöglichte, mit wenig RNA möglichst viele cDNAs zu verifizieren. Vorangegangene Erfahrungen mit RNA-amplifizierenden Verfahren (z.b. SMART-Protokoll von Clontech, Katalog-Nr.: K1052-1) forderten aufgrund von PCR-Artefakten eine lineare Verifikationsmethode. Weiterhin sollten die Verifikationsergebnisse gut mit einem Phosphorimager quantifizierbar sein.

Diese Forderungen wurden von der Methode des Reversen-Northern-Blots erfüllt. Im Gegensatz zum konventionellen Northern-Blot, bei dem die zu hybridisierende RNA auf einen Nylonfilter übertragen wird, werden beim Reversen-Northern-Blot die zu untersuchenden cDNAs aufgespottet. Als Hybridisierungssonde dienen RNA-Proben, die mit $\alpha^{32}\text{P}$ -dATP revers transkribiert werden. Auf dem Verfahren des Reversen-Northern-Blots basiert auch die hochaktuelle cDNA-Array-Technologie.

2.5.2 Die praktische Durchführung des Reversen-Northern-Blots

2.5.2.1 Die Plasmid-Isolation mit dem QIAGEN Minipräp-System

Für die Anfertigung der Dot-Blot-Filter war es notwendig, eine ausreichende Menge an Insert-DNA zu regenerieren. Dafür wurde mit dem Minipräp-System der Firma Qiagen (Katalog-Nr.: 12125) ein Isolierungsverfahren angewendet, welches hochwertige, d.h. vollständig durch Endonukleasen verdaubare sowie gut sequenzierbare Plasmid-DNA lieferte und gleichzeitig schnell durchführbar war. Die Ausbeute der einzelnen Minipräps aus einer 5 ml Kultur war sehr einheitlich und betrug je Aufarbeitung rund 25 μg . Die Lagerung der Minipräps erfolgte bei -20°C .

2.5.2.2 Herstellung der cDNA-Dot-Blots

Um im Labormaßstab „cDNA-Arrays“ herstellen zu können, wurde das Dot-Blot-96-System von BIOMETRA verwendet (Abb. 2/5). Dieses ermöglichte es, im bequemen Mikrotiterformat (8 x 12) zu arbeiten. Durch die Anordnung der Probenpositionen war es möglich, Multikanalpipetten einzusetzen.

Für das Auftragen der cDNA-Proben auf den Nylonfilter wurde als Grundlage das Protokoll für die Herstellung von Dot-Blots aus „Current Protocols in Molecular Biology“ (Ausubel 1991) verwendet. Dieses Protokoll ermöglichte es, bei Benutzung einer Dot-Blot-Anlage DNA auf positiv geladene Nylonmembranen aufzutragen. Positiv geladene Nylonmembranen haben die Eigenschaft, DNA kovalent bei hohem pH-Wert zu binden. Deshalb wurden die DNAs für das Dot-Blotten vorher in alkalischem Puffer inkubiert.

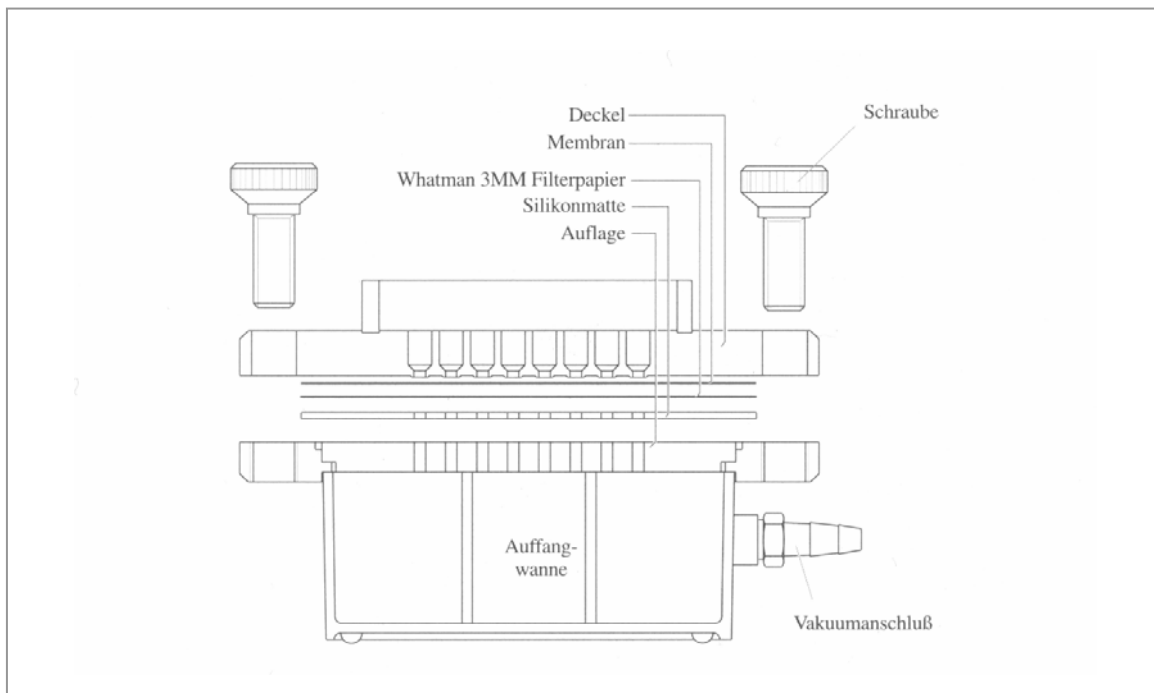


Abb. 2/5
Aufbau des DOT-Blot-96-Systems

Optimierungsversuche für die Durchführung des Reversen-Northern-Blots zeigten, dass es notwendig war, die Vektor-DNA vollständig von der Insert-DNA zu trennen. In Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass der für die Klonierung verwendete pCR®II-Vektor sehr starke unspezifische Hybridisierungssignale zur Folge hatte, die z. T. stärker als die spezifischen Hybridisierungssignale waren. Aus diesem Grund wurde das Insert durch einen EcoRI-Verdau herausgeschnitten. Anschließend erfolgte eine gelelektrophoretische Auftrennung von Insert und Vektor sowie die Aufreinigung des Inserts mit dem Qiagengeleextraktionskit (Pkt. 2.3.2.6). Nach Aufreinigung lag die Insert-DNA in 50 µl Eluationspuffer (TE pH= 8,0) vor.

Durchführung:

Für die Herstellung der Dot-Blots wurden zwei PCR-Platten im 96-Loch-Format benötigt. Die ersten drei Achterreihen der ersten PCR-Platte wurden mit Insert-DNA befüllt (immer im Duplikat) sowie für die Kontrollhybridisierungsspot mit EcoRI-linearisierter β -Aktin-Plasmid-DNA. Je 20 µl Insert-DNA wurden pro Loch pipettiert. Das Ganze wurde mit 180 µl der Denaturierungslösung für Dot-Blots aufgefüllt. 200 µl stellten für die PCR-Platte als auch für die Multikanalpipette das größtmögliche Volumen dar. Wie schon erwähnt, müssen die Volumina bei allen Pipettierschritten so groß wie möglich gehalten werden, um mögliche Fehler zu minimieren. 20-mal wurde jede Reihe mit vorgelegter Insert- und β -Aktin-DNA auf- und abpipettiert. Eine sehr gründliche Durchmischung der Insert-DNA mit dem Puffer wurde so erreicht. Je 45 µl des Insert-Puffer-Gemisches aus der ersten Reihe der ersten PCR-Platte wurden in Reihe 1, 4, 7 und 10 der zweiten PCR-Platte pipettiert. Analog wurde für die Reihe 2 (2. PCR-Platte: Reihen 2, 5, 8 und 11) und 3 (2. PCR-Platte: Reihen 3, 6, 9 und 12) der ersten PCR-Platte vorgegangen. Die Reihen wurden mit 115 µl Denaturierungslösung für Dot-Blots je Loch aufgefüllt. Dann wurden die Proben in der zweiten PCR-Platte im PCR-Gerät der Firma Eppendorf bei 99 °C für 10 min

bei geöffnetem PCR-Gerät-Deckel inkubiert. Nach 10-minütiger Denaturierung wurden die Proben aus dem PCR-Gerät entnommen und kühlten bei Raumtemperatur ab.

In der Zwischenzeit wurde ein 8 x 12 cm groß zurechtgeschnittener Nylonfilter sowie ein gleich großes 3 MM Whatman-Filterpapier in die Dot-Blot-Anlage eingespannt (Abb. 2/5). Sowohl der Filter als auch das Filterpapier waren in trockenem Zustand. Nach dem Zusammenbauen wurde der Nylonfilter im eingespannten Zustand äquilibriert. Vakuum wurde angelegt. 2 x 200 µl Aqua dest. je Loch sowie 2 x 200 µl Denaturierungslösung wurden mit der Multikanalpipette aufgetragen. Die Schrauben der Dot-Blot-Anlage waren bei der Äquilibration noch nicht zu straff angezogen, so dass der Nylonfilter und das Filterpapier nach dieser Behandlung gleichmäßig durchfeuchtet waren. Danach wurden die Schrauben gleichmäßig so fest angezogen, dass eine optimale Abdichtung der Löcher durch die Silikonmatte erfolgte.

Die denaturierten, abgekühlten Proben wurden mit der Multikanalpipette aufgetragen. Die Proben wurden vollständig durchgesaugt, bis die Nylonfilterflächen in den Löchern trocken aussahen. Um die Qualität des Aufbringens der DNA (z.B. unzureichende Abdichtung der Silikonmatte) zu überprüfen, wurden 10 ml Denaturierungslösung mit 100 µl BPB für Dot-Blots versetzt. 30 µl dieser Lösung wurden je Loch mit der Multikanalpipette aufgetragen und vollständig trocken gesaugt. Die Vakuumpumpe wurde abgeschaltet. Der Filter mit der aufgetragenen DNA wurde aus der Dot-Blot-Anlage entnommen und für exakt 1 min in 2 x SSC geschwenkt. Anschließend wurde er im 37 °C-Brutraum luftgetrocknet. Nach der Trocknung wurde er für 15 min bei 120 °C gebacken, so dass die DNA endgültig kovalent mit dem Nylonfilter verbunden war. Der Nylonfilter wurde in vier mit den unterschiedlichen Vergleichsproben (LXSN, LXSN+FCS/Ca²⁺, HPV16E6 und HPV16E6+FCS/Ca²⁺) zu hybridisierende Abschnitte zerschnitten. Bis zum Gebrauch wurden die Nylonfilter trocken und lichtgeschützt bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Denaturierungslösung für Dot-Blots	BPB für Dot-Blots
0,4 M NaOH 10 mM EDTA pH = 8,0	wenige Kristalle Bromphenolblau wurden in TE-Puffer pH = 8,0 gelöst.

2.5.2.3 Markierung der Hybridisierungsproben

Für die radioaktive Markierung der RNA-Proben wurde das bei den cDNA-Arrays verwendete Verfahren der reversen Transkription mit einem radioaktiven Nukleotid durchgeführt. Die Markierung der RNA-Proben sowie die Abtrennung der freien Nukleotide erfolgten analog zu den ATLASTM-cDNA-Arrays (Pkt. 2.4.2).

2.5.2.4 Hybridisierung der Nylonfilter

Obwohl das Prinzip der ATLASTM-cDNA-Arrays bei der Markierung der Hybridisierungssprobe übernommen werden konnte, war es beim Schritt der Hybridisierung des Nylonfilters erforderlich, das Protokoll zu optimieren. Die Hybridisierung der selbst hergestellten cDNA-Filter wurde mit der sich bei der ATLASTM-cDNA-Array-Hybridisierung bewährten ExpressHybTM-

Hybridisierungslösung der Firma Clontech (Katalog-Nr.: 8015-1) vorgenommen. Die Hybridisierung erfolgte nach dem Protokoll im Handbuch Protokoll-Nr.: PT1190-1 (PRO7933).

2.5.2.5 Autoradiografie der Dot-Blots

Nach Hybridisierung der Filterabschnitte mit den Vergleichsproben erfolgte als Erstes eine Exposition auf Röntgenfilm. Dazu wurden die Filterabschnitte der zu vergleichenden Proben nebeneinander aufgelegt und über Nacht bei -80°C exponiert. Am nächsten Tag wurde der Röntgenfilm entwickelt. Erstmals konnte die Qualität der hergestellten Dot-Blot-Filter in Hinblick auf das gleichmäßige Aufspotten der cDNAs und auch der Hybridisierung erfolgen. Die im Duplikat gespotteten Proben wurden auf Gleichmäßigkeit überprüft. Waren die Filter in Ordnung, wurden sie anschließend mit dem Phosphorimager vermessen. Filter, die den Qualitätsanforderungen nicht standhielten, wurden verworfen und erneut hergestellt.

2.5.2.6 Auswertung der Dot-Blot-Filter mit dem Phosphorimager

Die Filter wurden in den Expositionskassetten des Phosphorimagers erneut exponiert. Um falsch positive bzw. falsch negative Ergebnisse zu vermeiden, wurden mindestens drei verschiedene Expositionszeiten je Filtersatz gewählt. Die kürzeste Exposition erfolgte über 2 Stunden, die längste über Nacht. Die einzelnen Spots wurden vermessen. Die Messergebnisse flossen anschließend in die in Abb. 2/6 beschriebene Berechnung ein.

2.6 Die Sequenzierung der als HPV16E6-reguliert identifizierten cDNA-Klone

Für die Sequenzierung der „Differential Display of mRNA“-cDNAs sowie für die Überprüfungssequenzierung der ATLASTM-cDNAs wurde das Sequenzierungskit der Firma Amersham Life Science benutzt. Dieses System arbeitet nach der „Cycler-Sequencing“ Methode, die wiederum auf der konventionellen Methode für DNA-Sequenzierung nach Maxam und Gilbert beruht. Der Gellauf und die automatisierte Auswertung erfolgten mit dem Licor DNA-Sequencer Model 4000.

2.7 Die sekundäre Verifikation durch Northern-Blot-Hybridisierungen

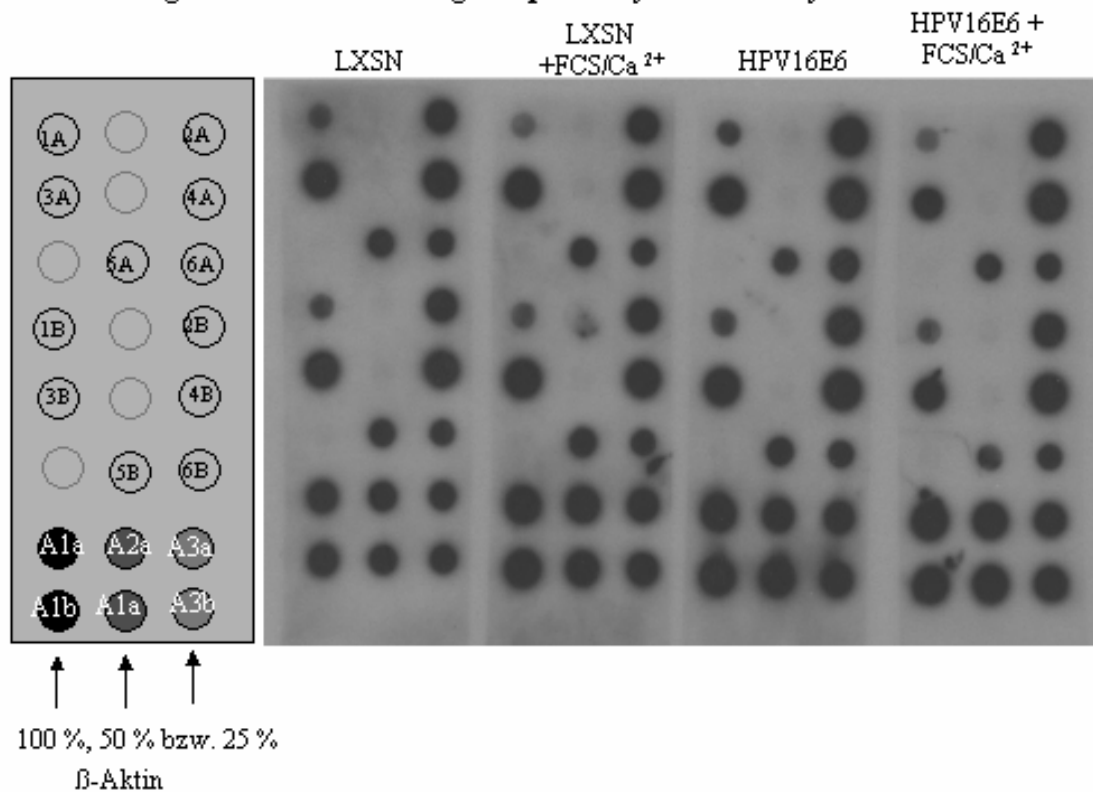
2.7.1 Die elektrophoretische Auftrennung der RNA im Agarose-Gel

Für die sekundäre Verifikation der differentiellen Genexpression wurden die für diese Untersuchungen eingesetzten RNA-Vergleichsproben nebeneinander in einem 1 %igen Agarose-Gel nach dem Molekulargewicht aufgetrennt. Als Laufpuffer wurde 1 x MOPS verwendet. Der MOPS-Puffer wurde als 20 x Stammlösung angesetzt. Die Stammlösung wurde bei 4°C dunkel im Kühlschrank aufbewahrt.

Für die Präparation des Agarosegels wurden je 100 ml Gel 1 g Agarose mit 100 ml 1 x MOPS-Puffer in der Mikrowelle aufgeköcht, bis die Agarose vollständig, d.h. ohne Schlierenbildung, in

Auswertung der Reversen-Northern-Blot-Hybridisierungen

1. Autoradiogramme der mit den Vergleichsproben hybridisierten Nylonfilterabschnitte



2. Phosphorimager-Messung der radioaktiven Counts je Spot

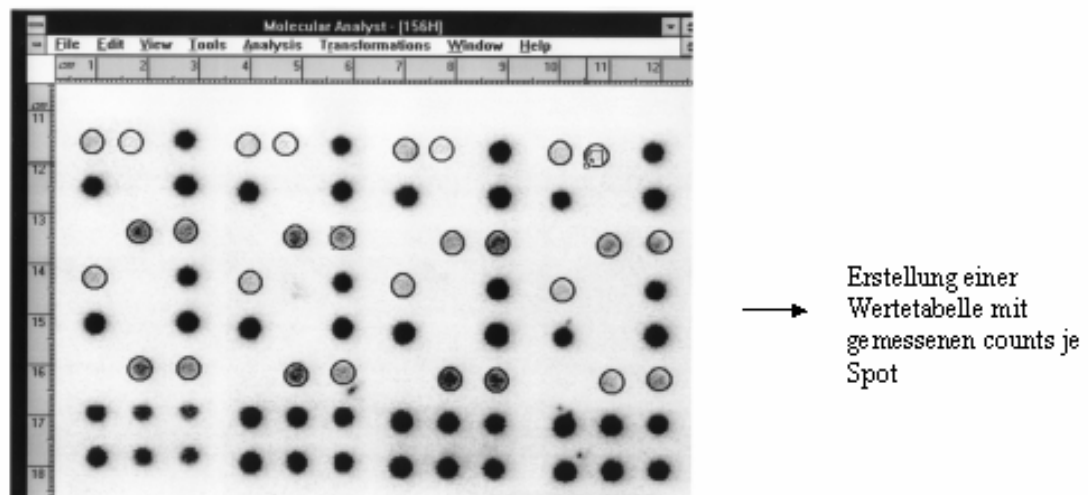



Abb. 2/6 Berechnung für Dot-Blot-Hybridisierungen

3. Berechnung der relativen Expressionsstärke in den Vergleichsproben

$$\begin{array}{lcl}
 \beta\text{-Aktin } 100 \%: \frac{A1a + A1b}{2} & = & \cancel{\emptyset} A1_{100\%} \\
 \beta\text{-Aktin } 50 \%: \frac{A2a + A2b}{2} & = & \cancel{\emptyset} A2_{50\%} \\
 \beta\text{-Aktin } 25 \%: \frac{A3a + A3b}{2} & = & \cancel{\emptyset} A3_{25\%}
 \end{array}
 \left. \vphantom{\begin{array}{lcl} \beta\text{-Aktin } 100 \%: \frac{A1a + A1b}{2} \\ \beta\text{-Aktin } 50 \%: \frac{A2a + A2b}{2} \\ \beta\text{-Aktin } 25 \%: \frac{A3a + A3b}{2} \end{array}} \right\}
 \begin{array}{c}
 A1_{100\%} + A2_{50\%} + A3_{25\%} \\
 \hline
 3 \\
 = \\
 \cancel{\emptyset} \beta\text{-Aktin-Wert des Filters (in counts)}
 \end{array}$$

4 Vergleichsfilter 

$$\begin{array}{lcl}
 \cancel{\emptyset} \beta\text{-Aktin}_{LXSN} & = & A_{LXSN} \\
 \cancel{\emptyset} \beta\text{-Aktin}_{LXSN+FCS/Ca2+} & = & A_{LXSN+FCS/Ca2+} \\
 \cancel{\emptyset} \beta\text{-Aktin}_{HPV16E6} & = & A_{HPV16E6} \\
 \cancel{\emptyset} \beta\text{-Aktin}_{HPV16E6+FCS/Ca2+} & = & A_{HPV16E6+FCS/Ca2+}
 \end{array}$$

Faktorbildung:	$F_{LXSN} = \frac{A_{LXSN}}{A_{LXSN}} = 1$
	$F_{LXSN+FCS/Ca2+} = \frac{A_{LXSN+FCS/Ca2+}}{A_{LXSN}}$
	$F_{HPV16E6} = \frac{A_{HPV16E6}}{A_{LXSN}}$
	$F_{HPV16E6+FCS/Ca2+} = \frac{A_{HPV16E6+FCS/Ca2+}}{A_{LXSN}}$

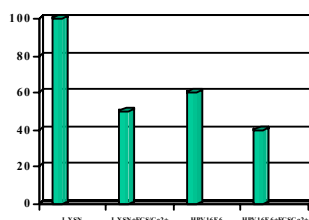
$$\begin{array}{lcl}
 1a_{LXSN} \times F_{LXSN} = 1a_{LXSN(a)} & & \\
 \text{(mit } \beta\text{-Aktin abgeglichener Wert der untersuchten cDNA 1, Spot a, Filter LXSN)} & & \\
 1b_{LXSN} \times F_{LXSN} = 1b_{LXSN(a)} & & \\
 \text{(mit } \beta\text{-Aktin abgeglichener Wert der untersuchten cDNA 1, Spot b, Filter LXSN)} & & \\
 1a_{LXSN+FCS/Ca2+} \times F_{LXSN+FCS/Ca2+} = 1a_{LXSN+FCS/Ca2+(a)} & & \\
 \text{(mit } \beta\text{-Aktin abgeglichener Wert der untersuchten cDNA 1, Spot a, Filter LXSN+FCS/Ca2+)} & & \\
 1b_{LXSN+FCS/Ca2+} \times F_{LXSN+FCS/Ca2+} = 1b_{LXSN+FCS/Ca2+(a)} & & \\
 \text{(mit } \beta\text{-Aktin abgeglichener Wert der untersuchten cDNA 1, Spot a, Filter LXSN+FCS/Ca2+)} & & \\
 1a_{HPV16E6} \times F_{HPV16E6} = 1a_{HPV16E6(a)} & & \\
 \text{(mit } \beta\text{-Aktin abgeglichener Wert der untersuchten cDNA 1, Spot a, Filter HPV16E6)} & & \\
 1b_{HPV16E6} \times F_{HPV16E6} = 1b_{HPV16E6(a)} & & \\
 \text{(mit } \beta\text{-Aktin abgeglichener Wert der untersuchten cDNA 1, Spot a, Filter HPV16E6)} & & \\
 1a_{HPV16E6+FCS/Ca2+} \times F_{HPV16E6+FCS/Ca2+} = 1a_{HPV16E6+FCS/Ca2+(a)} & & \\
 \text{(mit } \beta\text{-Aktin abgeglichener Wert der untersuchten cDNA 1, Spot a, Filter HPV16E6+FCS/Ca2+)} & & \\
 1b_{HPV16E6+FCS/Ca2+} \times F_{HPV16E6+FCS/Ca2+} = 1b_{HPV16E6+FCS/Ca2+(a)} & & \\
 \text{(mit } \beta\text{-Aktin abgeglichener Wert der untersuchten cDNA 1, Spot a, Filter HPV16E6+FCS/Ca2+)} & &
 \end{array}$$

Bildung des Mittelwerts von $1a_{LXSN(a)}$ und $1b_{LXSN(a)}$

Bildung des Mittelwerts von $1a_{LXSN+FCS/Ca2+(a)}$ und $1b_{LXSN+FCS/Ca2+(a)}$

Bildung des Mittelwerts von $1a_{HPV16E6(a)}$ und $1b_{HPV16E6(a)}$

Bildung des Mittelwerts von $1a_{HPV16E6+FCS/Ca2+(a)}$ und $1b_{HPV16E6+FCS/Ca2+(a)}$



Grafische Auswertung

(Mit β -Aktin abgegliche Mittelwerte für cDNA 1 in den Vergleichsproben)



Lösung gegangen war. Danach wurde das verdunstete Wasser wieder aufgefüllt und das Gel wurde auf etwa 60 °C abgekühlt. 10 µl Ethidiumbromidstammlösung (10 mg/ml) wurden je 100 ml Gelvolumen dem noch flüssigen Agarosegel zugegeben und gut vermischt.

Die RNA-Proben wurden vor dem Auftragen auf das Gel denaturiert. Für die Denaturierung wurde die RNA zusammen mit Formaldehyd und Formamid bei 65 °C inkubiert. Die genaue Zusammensetzung der RNA-Probe und die Inkubationszeiten sind unten angegeben.

20 x MOPS-Puffer
400 mM MOPS
100 mM Natriumazetat
20 mM EDTA
mit NaOH pH = 7,0 einstellen

RNA-Ladepuffer
50 % Glycerin
1 mM EDTA (pH = 8,0)
0,25 % Bromphenolblau
0,25 % Xylencyanol

Ansatz je RNA-Probe	
RNA (5 µg)	6,5 µl (Volumen evtl. mit DEPC-behandeltem Aqua dest. auffüllen)
20 x MOPS - Puffer	0,5 µl
Formaldehyd	3,5 µl
Formamid	10 µl
- 15 min bei 65 °C inkubieren auf Eis stellen	
- 2 µl RNA-Gel-Lade-Puffer dazugeben, gut mischen und kurz abzentrifugieren	

2.7.2 Northern-Blot

Der Northern-Blot wurde mit dem Vakuumblotter 270 BR (Biometra) durchgeführt. Nach Beendigung der gelelektrophoretischen Auftrennung der RNA-Moleküle wurde das Gel 3 x 15 min in 10 x SSC inkubiert. Ein Nylonfilter wurde etwas größer als das zu blottende Gel zurechtgeschnitten. Parallel zur letzten Inkubation des Gels in 10 x SSC wurde der Nylonfilter 5 min in DEPC-Aqua dest. und anschließend für 10 min in 10 x SSC äquilibriert.

Die Blottvorrichtung wurde zusammengebaut. Der Nylonfilter wurde auf ein ebenfalls mit 10 x SSC befeuchtetes Whatmann-Filterpapier gelegt. Eine die Blottvorrichtung abdichtende Plastikfolie mit einer etwas kleineren Aussparung im Zentrum als das Gelformat wurde als Nächstes in die endgültige Position gebracht. Anschließend wurde das zu blottende Gel auf die in der Folie enthaltene Aussparung gelegt. Für einen luftdichten Abschluss wurde Haushaltsfolie über das Gel bis zu den Rändern der Gelapparatur gespannt. Der Vakuumblotter wurde vollständig geschlossen. Ein durch eine Membranpumpe erzeugtes Vakuum von 5 mm Hg wurde angelegt. Durch dieses Vakuum wurde die Flüssigkeit im Gel durch die Nylonmembran durchgesaugt. Durch diesen Sog kam es zu einem Transport der RNA-Moleküle. Dieser wird durch Bindung der negativ geladenen RNA an die positiv geladene Nylonmembran beendet. Nach 60 min wurde das Vakuum aufgehoben. Die Blottvorrichtung wurde geöffnet und die Haushaltsfolie entfernt. Die Geltaschen wurden mit einem Bleistift auf den Nylonfilter übertragen. Anschließend wurde das Gel vorsichtig entfernt. Der Nylonfilter wurde anschließend für 5 min in 2 x SSC geschwenkt und auf Filterpapier luftgetrocknet.

Die Trocknung des Filters wurde vorerst nicht vollständig durchgeführt, sondern nur solange, bis keine „freie“ Flüssigkeit mehr auf seiner Oberfläche zu sehen war. Es folgte ein UV-

Crosslinking zur irreversiblen Bindung der RNA an den Filter mit dem Gerät UV-Crosslinker GS Gene LinkerTM (Biorad) und einer Energie von 125 kJ. Die 18S- und 28S-rRNAs, die durch UV-Licht sichtbar gemacht werden können, wurden auf dem UV-Tisch eingezeichnet. Anschließend wurde der Filter vollständig luftgetrocknet. Bis zur Hybridisierung wurde der RNA-Filter eingepackt in Filterpapier und einer Plastiktüte trocken und lichtgeschützt aufbewahrt.

2.7.3 Hybridisierung von Northern-Blots

2.7.3.1 Radioaktive Markierung von DNA

Zur Markierung der DNA-Sonden wurde das Random Primed Labeling Kit von Boehringer Mannheim eingesetzt. Als radioaktives Nukleotid wurde $\alpha^{32}\text{P}$ -dATP verwendet. In dieser Arbeit wurde bevorzugt Insert-DNA für die Markierung eingesetzt. Die Inserts wurden durch Minipräparation (Pkt. 2.5.2.1), anschließenden EcoR1-Verdau und Gelextraktion (Pkt. 2.3.2.6) aufgearbeitet. Die Markierung erfolgte laut Vorschrift. Die Abtrennung der freien Nukleotide erfolgte mit „Quick Spin Columns“ (Roche) nach Vorschrift. Mit dem Radioaktivitätszählgerät wurde die Qualität des radioaktiven Einbaus überprüft. Die Probe wurde bis zur Hybridisierung im Kühlschrank aufbewahrt.

2.7.3.2 Hybridisierungslösungen und -bedingungen

Die Hybridisierung der Northern-Blots mit den markierten cDNA-Proben erfolgte mit den unten angegebenen Vorhybridisierungs- und Hybridisierungslösungen. Je Northern-Blot-Filter wurden 5 ml Vorhybridisierung- bzw. Hybridisierungslösung eingesetzt. Die zwei Teile der Vorhybridisierungslösung wurden mit Ausnahme des 10 %igen SDS in Teil 1 zusammenpipettiert und zur vollständigen Denaturierung der tRNA mindestens 5 Minuten in diesem Zustand inkubiert. In der Zwischenzeit, d.h. innerhalb der 5 Minuten Inkubationszeit, wurde der Northern-Blot-Nylonfilter in einer Schale mit Aqua dest. angefeuchtet und so in die Hybridisierungsflasche gelegt, dass sich zwischen Glaswand und dem Filter keine Luftblasen befanden.

Nach Ablauf der geforderten 5-minütigen Inkubation von Teil 1 der Vorhybridisierungslösung wurde diesem die angegebene Menge 10 %iges SDS zugesetzt. Teil 1 und Teil 2 der Vorhybridisierungslösung wurden vereinigt und gut gemischt in die Hybridisierungsflasche mit dem Filter überführt. Sofort wurde die Hybridisierungsflasche in den Inkubationsofen eingespannt und bei einer Rotationsgeschwindigkeit von 7 rpm bei 42 °C inkubiert. Die Vorhybridisierung wurde für mindestens 2 Stunden durchgeführt.

Kurz vor Abschluss der Vorhybridisierung wurden Teil 1 (wiederum noch ohne 10 %iges SDS) und Teil 2 der Hybridisierungslösung präpariert. In den Teil 1 wurde die radioaktiv markierte Hybridisierungssonde pipettiert und für mindestens 5 min denaturiert. Danach wurde die Hybridisierungsflasche aus dem Hybridisierungsofen geholt, die Vorhybridisierungslösung wurde verworfen. Das 10 %ige SDS wurde dem 1. Teil der Hybridisierungslösung zugegeben. Die zwei Teile der Hybridisierungslösung wurden gemischt und vorsichtig, ohne den Nylonfilter direkt damit zu benetzen, in die Hybridisierungsflasche gefüllt. Diese wurde wieder geschlossen

und in den Hybridisierungssofen getan. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 42 °C und 7 rpm.

Kurz vor Abschluss der Hybridisierung wurde 1 l Waschlösung für Northern-Blots wie unten angegeben angesetzt. Die Waschlösung wurde auf drei Glaswannen im Wasserschüttelbad verteilt und auf 68 °C erwärmt. Nach Erreichen der Waschtemperatur wurde die Hybridisierungsflasche aus dem Hybridisierungssofen entnommen. Der Nylonfilter wurde in die erste Glaswanne mit der Waschlösung überführt. Dort wurde er unter ständigem Schütteln 30 min inkubiert. Dieser Waschschrift wurde in Wanne zwei und drei wiederholt, so dass der Filter 3 x in frischer Waschlösung für 30 min bei 68 °C geschwenkt wurde.

Natrium-Phosphatpuffer pH = 7,0		
57,7 ml	1 M Na ₂ HPO ₄	(13,8 g + 100 ml H ₂ O)
42,3 ml	1 M NaH ₂ PO ₄	(14,2 g je 100 ml H ₂ O)

50 x Denhardts Reagenz	Waschlösung
1g BSA (Rinderserumalbumin)	2 x SSC
1 g Polyvinylpyrrolidon	0,1 % SDS)
1 g Ficoll 400	
mit Aqua dest. auf 100 ml auffüllen, steril filtrieren	

Vorhybridisierungslösung

	Lösung 1				Lösung 2			
Volumen	100% Formamid	t-RNA (10mg/ml TE pH = 7,6 gelöst))	5 min warten	10 % SDS	20 x SSC	50 x Denhardts Reagenz	1 M NAPP pH= 7,0	H ₂ O
5 ml	2,5 ml	50 µl		0,5 ml	1,25 ml	100 µl	0,25 ml	0,35 ml

Hybridisierungslösung

	Lösung 1				Lösung 2				
Volumen	100% Formamid	t-RNA (10mg/ml TE pH = 7,6 gelöst))	³² P - DNA	5 min warten	10 % SDS	20 x SSC	50 x Denhardts Reagenz	1 M NAPP pH= 7,0	H ₂ O
5 ml	2,5 ml	50 µl	X		0,5 ml	1,25 ml	100 µl	0,1 ml	0,5 – X ml

2.7.3.3 Exposition der hybridisierten Northern-Blots

Nach Hybridisierung, Waschen und Trocknen der Northern-Blot-Nylonfilter wurden diese vorerst einer Autoradiografie auf Röntgenfilm bei -80 °C unterzogen (Expozeiten zwischen 30 min und 14 Tagen). Nach Auswertung der Expressionsmuster wurden interessante Northern-Blots (wenn möglich) quantitativ mit dem Phosphorimager ausgewertet.

3 Ergebnisse

3.1 Nachweis der durch HPV16E6 bedingten differentiellen Genexpression auf transkriptioneller Ebene durch das „Differential Display of mRNA“

3.1.1 Vergleich der Genexpressionsmuster zwischen HPV16E6- und LXS^N-transduzierten humanen primären Keratinozyten

Mit Hilfe des „Differential Display of mRNA“ (Liang und Pardee 1992) war es möglich, einen Überblick über die Genexpression in den untersuchten Vergleichszellen zu gewinnen (Abb. 3/1). Die Genexpressionsmuster von HPV16E6-transduzierten Keratinozyten und Kontrollzellen von jeweils zwei Donoren wurden miteinander verglichen. RNA der 1. und 3. retroviralen Infektion sowie der 4. und 5. Infektion wurden gleichzeitig untersucht. Insgesamt wurden für die RNA der 1. und 3. Infektion 47 Primerpaare und für die der 4. und 5. Infektion 19 Primerpaare getestet. Theoretisch wäre eine größere Anzahl von Kombinationen an Revers- und Forwardprimern möglich. Aufgrund der limitierten RNA-Menge für die Verifikation und der aufwändigen Folgearbeiten wurde die Zahl der Kombinationen eingeschränkt. Der weitere Bearbeitungsschwerpunkt wurde auf die Verifizierung der „Differential Display of mRNA“-Ergebnisse gelegt. Da man annimmt, dass man mit einem Primerpaar rund 50 - 60 Gene in ihrer Expression visualisieren kann, wurden ungefähr 2500 zelluläre Gene mit dieser Untersuchungsmethode erfasst.

Es konnte gezeigt werden, dass es eine HPV16E6-bedingte differentielle Genexpression unter den gewählten experimentellen Bedingungen in den primären humanen Keratinozyten gab. Der Differenzierungsresistenz der mit HPV16E6 transduzierten Keratinozyten und der Ausbildung der typischen Kolonien lag unter anderem eine veränderte Genexpression zellulärer Wirtsgene zu Grunde. Es war möglich, verschiedene HPV16E6-abhängige Expressionsmuster zu beobachten. Bei einigen Genen konnte man sehen, dass die Transkription in Anwesenheit von HPV16E6 fast vollständig an- bzw. abgeschaltet war. Hierbei handelte es sich um positiv/negativ- bzw. negativ/positiv-Antworten (positiv im Sinne von vorhandener Expression, eine „Differential Display of mRNA“-Bande war detektierbar, negativ = keine detektierbare Expression nachweisbar, es war keine Bande im Autoradiogramm erkennbar). Bei den meisten durch HPV16E6 in ihrer Expression veränderten Genen war jedoch eine graduelle Veränderung der Expression festzustellen. Diese Gene wurden sowohl in den Kontrollzellen als auch in den HPV16E6-exprimierenden Zellen transkribiert. Es kam zu einer erhöhten (Abb. 3/1, cDNAs 33/4, 33/5, 33/6) bzw. verminderten (Abb. 3/1, cDNA T1) Expression auf mRNA-Ebene infolge der Transduktion des HPV16E6-Gens in die Keratinozyten. Die Expressionsstärke variierte dabei zwischen den zu vergleichenden Proben. Der Faktor der Verstärkung bzw. Abschwächung der Transkription war nicht sehr groß. Die detektierten Expressionsunterschiede bewegten sich bei diesen Genen schätzungsweise im Bereich von 200 - 400 %.

HPV16E6-bedingte Unterschiede auf transkriptionellem Niveau gab es sowohl bei Genen, deren Expression durch die Differenzierungsfaktoren beeinflusst wurde als auch bei solchen, deren Expression durch die Differenzierungsfaktoren nicht beeinflusst wurde. Die mittels des „Differential Display of mRNA“ entdeckten Unterschiede auf transkriptioneller Ebene konnten

in Gruppen sich wiederholender Expressionsmuster eingeteilt werden. Diese Muster sind im Pkt. 3.1.2 detailliert aufgeführt.

Neben den HPV16E6-regulierten Genen konnte mittels des „Differential Display of mRNA“ eine Anzahl von Genen identifiziert werden, die nur in Abhängigkeit der Differenzierungsfaktoren FCS und Kalzium differentiell exprimiert wurden (Abb. 3/1, cDNA 44/2). Die Expressionsunterschiede zwischen unbehandelten und mit FCS und Kalzium behandelten Kontrollzellen waren mit denen in den HPV16E6-exprimierenden Zellen identisch. Außerdem konnten viele Gene beobachtet werden, die in keiner Weise reguliert wurden (Abb. 3/1, cDNAs IV1 und IV2). Diese traten in den vier Vergleichsproben einer Infektion (LXSN, LXSN+FCS/Ca²⁺, HPV16E6, HPV16E6+FCS/Ca²⁺) als gleich starke Banden im Polyacrylamidgel auf.

Die Darstellung der Genexpression spiegelt die Individualität der verwendeten RNA-Proben (RNA der 1. und 3. bzw. 4. und 5. Infektionen) wider (Abb. 3/1). Durch den direkten Vergleich jeweils zweier Donoren konnte gezeigt werden, dass bei den HPV16E6-regulierten Genen sowohl Gemeinsamkeiten als auch Unterschiede in den Transkriptionsmustern zu verzeichnen waren. Es gab Gene, die in den beiden Vergleichsinfektionen der beiden gleichzeitig bearbeiteten Sets (1. und 3. Infektion bzw. 4. und 5. Infektion) das gleiche oder ein sehr ähnliches PCR-Bandenmuster erzeugten. Diese Gene wurden als „konsistent exprimiert“ charakterisiert (Abb. 3/1 cDNAs 33/4, 33/5, 33/6). Es gab jedoch auch eine Anzahl von Genen, deren Expression deutlich durch HPV16E6 reguliert wurde, deren PCR-Bandenmuster jedoch stark voneinander abwichen. Solche Gene wurden als „nicht-konsistent exprimiert“ bezeichnet. Als Arbeitshypothese wurde primär davon ausgegangen, dass es Gene gibt, die unabhängig vom Genotyp des Donors durch HPV16E6 in den Keratinozyten jedes individuellen Donors in gleicher Art und Weise hinsichtlich der Expressionsstärke zu einem bestimmten Zeitpunkt dereguliert werden. Eine solche ideale Wiederholung der experimentellen Ergebnisse wurde als konsistente Veränderung bezeichnet. In dieser Arbeit wurde großer Wert darauf gelegt, mit den durchgeführten molekularbiologischen Methoden diese Unterschiede zu detektieren und ihre theoretisch angenommene konsistente Expression zu zeigen. Zusätzlich wurden ebenfalls cDNAs mitgeführt, die nicht konsistent in den Vergleichsinfektionen exprimiert wurden, die aber in der einen oder der anderen Infektion besonders interessante Expressionsunterschiede zeigten.

Nachdem gezeigt wurde, dass es Unterschiede auf transkriptioneller Ebene zwischen HPV16E6-exprimierenden Zellen und Kontrollzellen gab, wurden alle interessanten cDNAs ausgeschnitten und in Aqua dest. eluiert (Material und Methoden Pkt. 2.3.2.4). Da das Verfahren des „Differential Display of mRNA“ ein sehr zeitaufwändiges molekularbiologisches Verfahren darstellt, lag der Schwerpunkt aller nach der Eluation durchgeführten Untersuchungen vorerst auf den cDNAs, deren Expression in den jeweils zwei verglichenen Infektionen als konsistent bezeichnet wurde. Insgesamt wurden 218 cDNAs aus dem Polyacrylamidgel isoliert und in Aqua dest. eluiert (Tab. 3/1 und Tab. 3/2). Bis zur Weiterbearbeitung wurden die cDNA-Proben bei -80 °C gelagert.

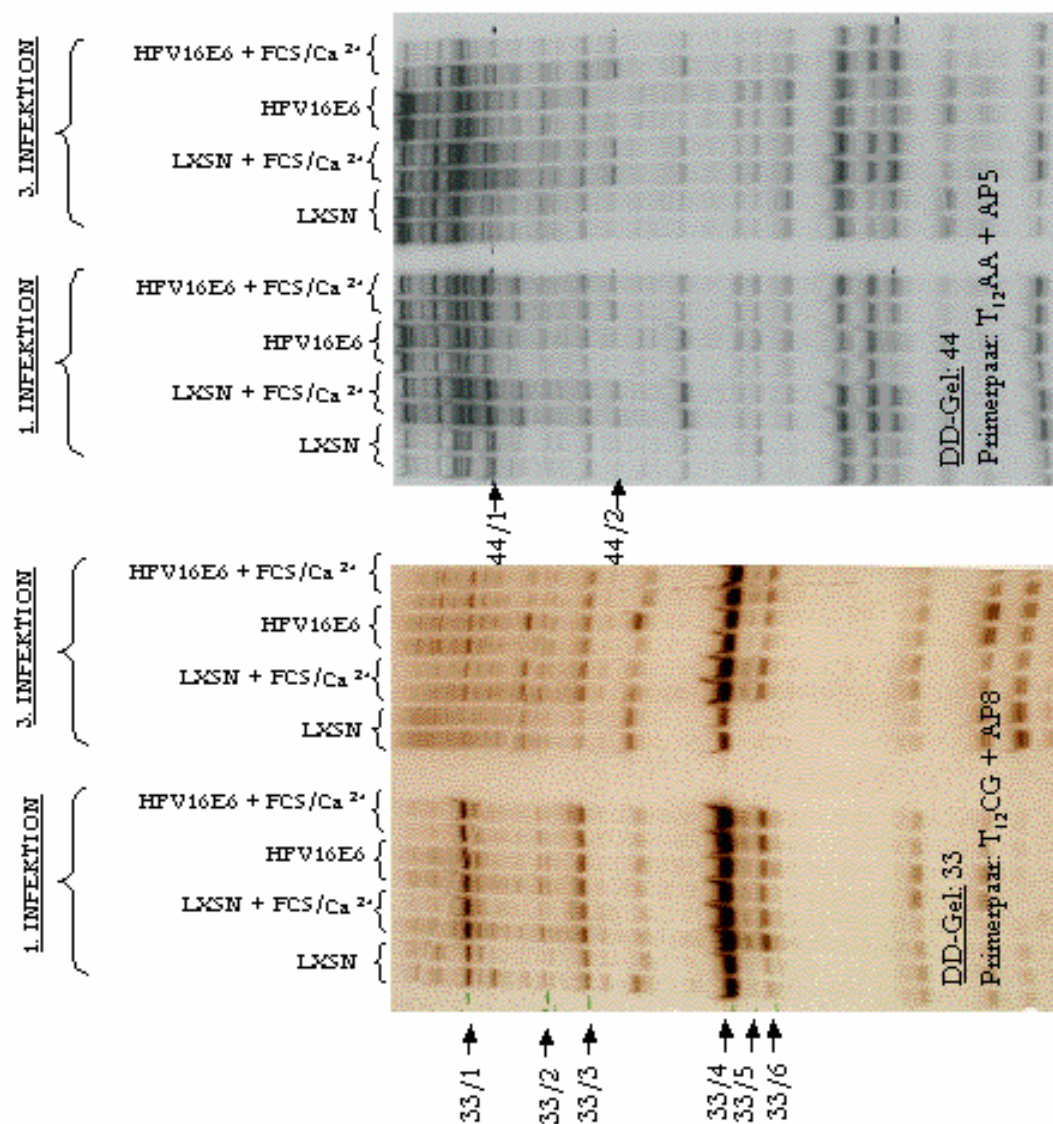
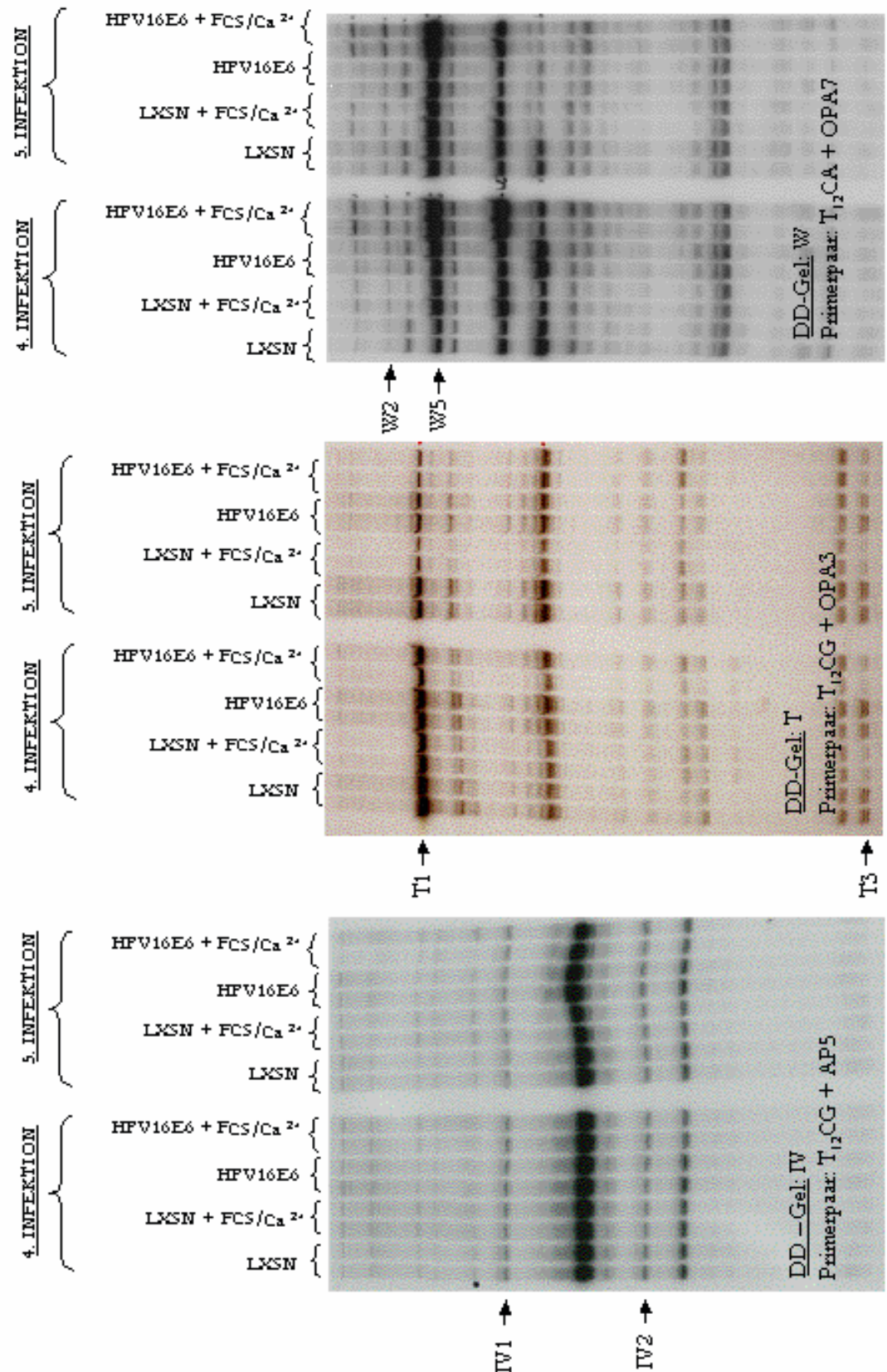


Abb. 3.1

Beispiel für „Differential Display of mRNA“-PAA-Autoradiogramme. Dargestellt sind zwei PAA-Gele für Untersuchungen der HPV16-bedingten differentiellen Genexpression in der 1. und 3. Infektion (oben) sowie drei PAA-Gele für die 4. und 5. Infektion (nächste Seite).



3.1.2 Zusammenstellung der Expressionsmuster differentiell exprimierter cDNAs

Die in den oben beschriebenen Untersuchungen detektierten cDNAs sind nach ihren in den „Differential Display of mRNA“-Polyacrylamidgelen beobachteten Expressionsmustern in Gruppen zusammengefasst worden (Tab. 3/1 und 3/2). Tab. 3/3 beschreibt detailliert alle aufgetretenen Muster, die in den Tab. 3/1 und 3/2 aufgeführt sind. Um differenzierungsrelevante Gene handelt es sich, wenn sich die Expressionsstärken in den Proben LXS_N und LXS_N+FCS/Ca²⁺ unterschieden. Diese Gene wurden nach Zugabe der Differenzierungsfaktoren stärker oder schwächer exprimiert. Für weitere Untersuchungen waren besonders die Gene interessant, bei denen nach Transduktion des viralen Onkoproteins HPV16E6 zusätzlich zur differenzierungsfaktorenabhängigen eine HPV16E6-abhängige Veränderung der Expression beobachtet werden konnte. Als Arbeitshypothese wurde angenommen, dass es sich vor allem bei diesen differenzierungsrelevanten und HPV16E6-regulierten Genen um zukünftige molekularbiologische Progressionsmarker für das Zervixkarzinom handeln könnte.

Es zeigte sich, dass beim Vergleich der Genexpressionsmuster mit Hilfe des „Differential Displays of mRNA“ in der 1. und 3. Infektion am häufigsten eine Subpopulation der differenzierungsrelevanten, HPV16E6-regulierten Gene zu beobachten war (Tab. 3/1). Bei dieser Gruppe konnte in den Proben LXS_N+FCS/Ca²⁺, HPV16E6 und HPV16E6+FCS/Ca²⁺ eine verstärkte Genexpression auf transkriptioneller Ebene im Vergleich zur Genexpression in der LXS_N-Probe detektiert werden (schematisches Expressionsmuster: $-\uparrow\uparrow\uparrow$) (Abb. 3/1 cDNA 33/1, 33/2, 33/4, 33/5 und 33/6). Am zweithäufigsten kam in der 1. und 3. Infektion eine Runterregulation der Genexpression sowohl durch die Differenzierungsfaktoren als auch durch das HPV16E6-Onkoprotein vor (schematisches Muster: $-\downarrow\downarrow\downarrow$). Auch diese Gene waren somit differenzierungsrelevant und HPV16E6-reguliert.

Andere vorherrschende Expressionsmuster konnten bei den Untersuchungen der RNA der 4. und 5. Infektion beobachtet werden (Tab. 3/2). Es konnten am häufigsten Gene detektiert werden, die nach Zugabe der Differenzierungsfaktoren schwächer exprimiert wurden und deren Expressionsstärke in den HPV16E6- und HPV16E6+FCS/Ca²⁺-Zellen im Vergleich zur LXS_N-Probe unverändert war (schematisches Expressionsmuster: $-\downarrow - -$). Bei diesen Genen handelte es sich ebenfalls um Mitglieder der Gruppe der differenzierungsrelevanten und HPV16E6-regulierten Gene. Die Abschwächung der Expression nach Zugabe der Differenzierungsfaktoren wurde durch das HPV16E6-Protein verhindert. Das am zweithäufigste detektierte Genexpressionsmuster bei den Untersuchungen der 4. und 5. Infektion mittels „Differential Display of mRNA“ war eine unveränderte Expression der Proben LXS_N+FCS/Ca²⁺ und HPV16 im Vergleich zur LXS_N-Probe, jedoch eine verstärkte Expression des Genes in der HPV16E6+FCS/Ca²⁺-Probe (schematisches Expressionsmuster: $- - - \uparrow$) (Abb. 3/1, cDNAs W2 und W5). Solche Gene waren in diesen Infektionen nicht differenzierungsrelevant, jedoch nach HPV16E6-Transduktion in differenzierungsfaktorenabhängiger Weise verändert exprimiert.

Expressionsmuster (vereinfacht)				Anzahl in 1. Infektion	Anzahl in 3. Infektion	Anzahl in 1. und 3. Infektion konsistent exprimierter Gene
LXSN	LXSN +FCS/Ca ²⁺	HPV16E6	HPV16E6 +FCS/Ca ²⁺			
–	–	–	↑	1	1	1
–	–	↑	↑	1	0	0
–	↑	↑	↑	49	38	36
–	↑	↑	–	3	10	3
–	↑	–	–	7	8	5
–	–	↑	–	7	6	4
–	–	–	↓	5	5	2
–	–	↓	↓	1	0	0
–	↓	↓	↓	20	13	13
–	↓	↓	–	0	1	0
–	↓	–	–	7	12	6
–	–	↓	–	12	8	6
				Σ = 113	Σ = 102	Σ = 76

Expressionsmuster (vereinfacht)				Anzahl in 4. Infektion	Anzahl in 5. Infektion	Anzahl in 4. und 5. Infektion konsistent exprimierter Gene
LXSN	LXSN +FCS/Ca ²⁺	HPV16E6	HPV16E6 +FCS/Ca ²⁺			
–	–	–	↑	12	11	8
–	–	↑	↑	8	3	1
–	↑	↑	↑	5	2	2
–	↑	↑	–	2	0	0
–	–	↑	–	2	1	1
–	–	–	↓	3	2	1
–	–	↓	↓	0	4	0
–	↓	↓	↓	2	6	1
–	↓	–	–	13	23	8
–	–	↓	–	0	2	0
–	↓	↓	–	0	0	0
				Σ = 47	Σ = 54	Σ = 22

Tab. 3/1 und 3/2

Zusammenstellung der in der 1. und 3. bzw. 4. und 5. Infektion aufgetretenen Expressionsmuster der HPV16E6-regulierten Gene.

Die Genexpression der mit Differenzierungsfaktoren behandelten Kontrollzellen (LXSN+FCS/Ca²⁺), der HPV16E6-transduzierten Keratinozyten und der mit Differenzierungsfaktoren behandelten HPV16E6-transduzierten Zellen wird im Vergleich zur Genexpression der unbehandelten mit dem Leervektor transduzierten Kontrollzellen (LXSN) angegeben.

(↑) = stärkere Genexpression im Vergleich zu den LXSN-Kontrollzellen, (–) = unveränderte Expressionsstärke im Vergleich zu den LXSN-Kontrollzellen, (↓) = schwächere Genexpression im Vergleich zu den LXSN-Kontrollzellen

Expressionsmuster (vereinfacht)				Kurzbezeichnung	Expressionsstärken
LXSN	LXSN +FCS/Ca ²⁺	HPV16E6	HPV16E6 +FCS/Ca ²⁺		
-	-	-	↑	A	LXSN=LXSN+FCS/Ca ²⁺ LXSN=HPV16E6 LXSN<HPV16E6+FCS/Ca ²⁺
-	-	↑	↑	B	LXSN=LXSN+FCS/Ca ²⁺ LXSN<HPV16E6 LXSN<HPV16E6+FCS/Ca ²⁺
-	↑	↑	↑	C	LXSN<LXSN+FCS/Ca ²⁺ LXSN<HPV16E6 LXSN<HPV16E6+FCS/Ca ²⁺
-	↑	↑	-	D	LXSN<LXSN+FCS/Ca ²⁺ LXSN<HPV16E6 LXSN=HPV16E6+FCS/Ca ²⁺
-	↑	-	-	E	LXSN<LXSN+FCS/Ca ²⁺ LXSN=HPV16E6 LXSN=HPV16E6+FCS/Ca ²⁺
-	-	↑	-	F	LXSN=LXSN+FC S/Ca ²⁺ LXSN<HPV16E6 LXSN=HPV16E6+FCS/Ca ²⁺
-	-	-	↓	G	LXSN=LXSN+FCS/Ca ²⁺ LXSN=HPV16E6 LXSN>HPV16E6+FCS/Ca ²⁺
-	-	↓	↓	H	LXSN=LXSN+FCS/Ca ²⁺ LXSN>HPV16E6 LXSN>HPV16E6+FCS/Ca ²⁺
-	↓	↓	↓	I	LXSN>LXSN+FCS/Ca ²⁺ LXSN>HPV16E6 LXSN>HPV16E6+FCS/Ca ²⁺
-	↓	↓	-	K	LXSN>LXSN+FCS/Ca ²⁺ LXSN>HPV16E6 LXSN=HPV16E6+FCS/Ca ²⁺
-	↓	-	-	L	LXSN>LXSN+FCS/Ca ²⁺ LXSN=HPV16E6 LXSN=HPV16E6+FCS/Ca ²⁺
-	-	↓	-	M	LXSN=LXSN+FCS/Ca ²⁺ LXSN>HPV16E6 LXSN=HPV16E6+FCS/Ca ²⁺
-	↑	-	↑	N	LXSN>LXSN+FCS/Ca ²⁺ LXSN=HPV16E6 LXSN>HPV16E6+FCS/Ca ²⁺ LXSN+FCS/Ca ²⁺ = HPV16E6+FCS
-	↓	-	↓	O	LXSN>LXSN+FCS/Ca ²⁺ LXSN=HPV16E6 LXSN>HPV16E6+FCS/Ca ²⁺ LXSN+FCS/Ca ²⁺ = HPV16E6+FCS/Ca ²⁺

Tab. 3/3

Darstellung der Expressionsmuster, die im „Differential Display of mRNA“ beobachtet werden konnten, und ihre Bedeutung. Der in der Spalte Kurzbezeichnung aufgeführte Buchstabencode wird im Folgenden beibehalten und in anderen Tab. und Abb. benutzt, um Expressionsmuster anzugeben.

(↑) = stärkere Genexpression im Vergleich zu den LXSN-Kontrollzellen, (-) = unveränderte Expressionsstärke im Vergleich zu den LXSN-Kontrollzellen, (↓) = schwächere Genexpression im Vergleich zu den LXSN-Kontrollzellen

3.1.3 Die Klonierung der mit „Differential Display of mRNA“ detektierten cDNAs

Für das „Differential Display of mRNA“ sind zwei Klonierungsstrategien beschrieben worden (Liang und Pardee 1995). Zum einen ist es möglich, die Klonierung vor der Verifizierung durchzuführen. Zum anderen wird der Weg beschritten, die falsch positiven Klone bereits vor der teuren und aufwändigen Klonierung zu eliminieren. Bei diesem zweiten Weg werden nur die positiven, d.h. z.B. im Northern-Blot verifizierten cDNAs, kloniert.

Innerhalb dieser Arbeit wurde zu Beginn die zweite Strategie favorisiert. Die Verifizierung wurde dabei mittels Northern-Blot durchgeführt. Als Hybridisierungsprobe diente das reamplifizierte PCR-Produkt, welches aus dem Agarosegel aufgereinigt und anschließend nach Feinberg und Vogelstein (1983, 1984) radioaktiv markiert wurde. Die Hybridisierung wurde durchgeführt, und sofern die Hybridisierungssignale dem Muster im „Differential Display of mRNA“ entsprachen, sollte das Reamplifikat kloniert werden. Oft besteht dabei das PCR-Amplifikat jedoch nicht nur aus einer einzigen cDNA-Spezies. Zum einen können Kontaminationen durch kurz darüber oder darunter laufende cDNA-Spezies auftreten, zum anderen gibt es die Möglichkeit, dass eine „Differential Display of mRNA“-Bande von Anfang an aus verschiedenen cDNAs gleicher Größe besteht. Es kann praktisch der Fall eintreten, dass man mit dieser Strategie je eluierte cDNA ($n+1$) Hybridisierungen durchführen muss (n = Anzahl der verschiedenen cDNA-Spezies, die sich in einem Reamplifikat befinden). Bei drei verschiedenen cDNAs in einer reamplifizierten Probe müsste man also bis zu vier Hybridisierungen durchführen, um den positiven Klon zu finden. Dabei würde eine Hybridisierung mit dem reamplifizierten unklonierten PCR-Produkt durchgeführt werden und die restlichen drei mit den klonierten cDNA-Proben. Für vier Filter werden 20 µg RNA je Vergleichsprobe benötigt. Es stellte sich innerhalb dieser Arbeit schnell heraus, dass dieser Weg mit den geringen Mengen an RNA je Transduktionsexperiment (50 - 100 µg) nicht durchführbar war. Die Anzahl der zu verifizierenden cDNAs stand im starken Widerspruch zu der zur Verfügung stehenden RNA-Menge.

Um genaue Ergebnisse zu erhalten, wurde auf eine mehrmalige Hybridisierung von RNA-Filtern verzichtet. Die Praxis zeigte, dass es aufgrund unzureichender Abwaschprotokolle („Stripping“) für RNA-Proben von Nylonfiltern nicht günstig war, die Filter mehrmals zu verwenden. Es kam u.a. zu Kreuzhybridisierungen der älteren und der neueren Proben, die mehr zur Verwirrung als zur Aufklärung der Genexpression führten. Sehr starke Hybridisierungsproben konnte man auch nach dem versuchten Abwaschen vom Filter detektieren. Aus diesem Grund wurde Wert darauf gelegt, die Filter nur ein einziges Mal zu hybridisieren und anschließend nur noch die Kontrollhybridisierung mit β -Aktin durchzuführen.

Da der limitierende Faktor dieser Arbeit konstant die RNA-Menge war, die für die Verifikation zur Verfügung stand, musste ein Weg gefunden werden, mit möglichst wenig RNA möglichst viele Gene zu verifizieren. Deshalb wurde innerhalb dieser Arbeit ein Protokoll für die Reverse-Northern-Blot-Hybridisierung etabliert. Mit Hilfe des Reversen-Northern-Blots war es möglich, eine primäre Verifikation der cDNAs durchzuführen.

Die cDNAs wurden vorbereitend für die Durchführung des Reversen-Northern-Blots reamplifiziert und sofort nach der PCR kloniert. Je klonierter cDNA wurden 10 Klone von der Petrischale isoliert. Da es feststand, dass bei vielen cDNAs nicht alle 10 Klone identisch waren, wurde ein Verfahren zur schnellen und aussagekräftigen Klonheterogenitätsanalyse entwickelt (Pkt. 2.3.2.8). Mit diesem Verfahren war es möglich, die unterschiedlichen Klone zu identifizieren. Von jedem als individuell erkannten Klon wurde eine Glyzerindauerkultur angelegt. Insgesamt konnten durch die Klonheterogenitätsanalyse aus diesen 98 reamplifizierten cDNAs 200 cDNA-Klone zusammengestellt werden. Es gab 39 reamplifizierte „Differential Display of mRNA“-cDNAs, bei der nur eine cDNA-Spezies kloniert wurde und somit alle inserthaltigen Klone der 10 gepickten identisch waren (siehe Tab. 6/2 des Anhangs). Das heißt, dass relativ viele Klonierungen den Idealfall einer einzigen klonierten cDNA-Spezies darstellten. Bei diesen Klonen kann man mit hoher Wahrscheinlichkeit davon ausgehen, dass es sich um ein HPV16E6-reguliertes Gen handelt. Andererseits konnte durch die Klonheterogenitätsanalyse aber auch gezeigt werden, dass die meisten cDNA-Reamplifikate verschiedene cDNA-Spezies enthielten und nach der Klonierung je isolierter „Differential Display of mRNA“-cDNA mindestens zwei verschiedene Klone vorlagen (Tab. 6/2 des Anhangs). Diese Vertreter zeigten, wie sinnvoll die Durchführung einer Klonheterogenitätsanalyse war und bestätigten die Notwendigkeit der Durchführung des Reversen-Northern-Blots.

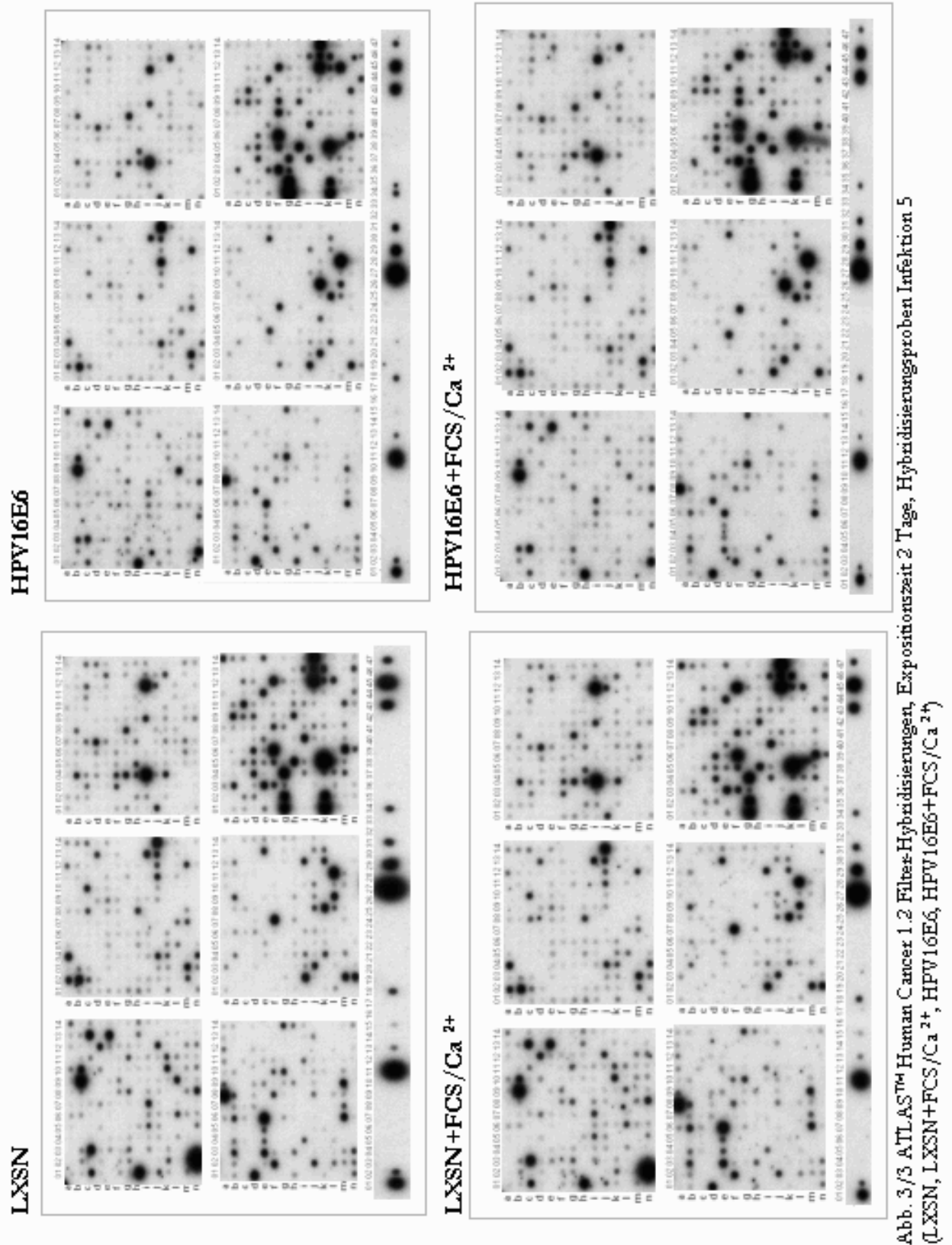
3.2 Nachweis der HPV16E6-bedingten differentiellen Genexpression mit ATLAS™-cDNA-Arrays

3.2.1 Die optische Auswertung der ATLAS™-cDNA-Arrays

Die Genexpressionsmuster der RNA-Proben der 4. und 5. Infektion wurden mit Hilfe der cDNA-Array-Technologie miteinander verglichen. Vier cDNA-Nylonfilter (Hybridisierungsproben: LXS_N, LXS_N+FCS/Ca²⁺, HPV16E6, HPV16E6+FCS/Ca²⁺) je Infektion wurden hybridisiert. Die mit den cDNA-Arrays gewonnenen Ergebnisse waren mit den Resultaten des „Differential Display of mRNA“ sehr gut vergleichbar (Abb. 3/2 und 3/3). Wie beim „Differential Display of mRNA“ konnte eine große Anzahl von Genen detektiert werden, die in Abhängigkeit von der Zugabe der Differenzierungsstimuli exprimiert wurden. Diese Gene wurden sowohl in den LXS_N-Kontrollzellen als auch den HPV16E6-exprimierenden humanen Keratinozyten in gleicher Weise vor und nach Zugabe der Differenzierungsfaktoren Kalzium (Ca²⁺) und Serum (FCS) exprimiert. Es konnte kein Einfluss des HPV16E6-Onkoproteins auf die Genexpression festgestellt werden. Die Expressionsstärke vieler anderer Gene wurde weder durch HPV16E6 noch durch Differenzierungsstimuli beeinflusst.

Insgesamt war rund ein Drittel der zellulären Gene so stark exprimiert, dass eine gute optische Auswertung und Quantifizierung nach Autoradiografie möglich war. Primär wurden die ATLAS™-cDNA-Arrays optisch ausgewertet, da am Anfang keine Software zur Verfügung stand, mit der man die Expression der aufgespotteten Gene gut quantifizieren konnte. Bei der optischen Auswertung wurden aufgrund der hohen Komplexität der Expressionsmuster anfangs nur die Proben LXS_N, LXS_N+FCS/Ca²⁺ sowie HPV16E6 miteinander verglichen (Tab. 3/4).





Auch bei diesem Vergleich wurde auf Konsistenz bei der Genexpression zwischen den Lysaten geachtet. Bei verschiedenen Genen konnten Veränderungen der Expression auf transkriptioneller Ebene durch HPV16E6 festgestellt werden. Nur acht Gene waren in beiden Vergleichsproben nach Auswertung der Filter LXS_N, LXS_N+FCS/Ca²⁺ und HPV16E6 konsistent exprimiert, d.h. die Expressionsmuster in den Infektionen 4. und 5 waren sehr ähnlich. Ein Gen wurde nur in Infektion 5 durch HPV16E6 differentiell exprimiert. Da der Expressionsunterschied sehr auffällig war und es sich um ein differenzierungsabhängiges und HPV16E6-reguliertes Gen handelte, wurde es für weitere Untersuchungen mitgeführt. Die beobachteten Unterschiede sind in Tab. 3/4 zusammengestellt. Nach Erwerb der Software ATLASImageTM-1.0 wurden die differentiell exprimierten Gene quantifiziert.

Klon-Nr.	Genbezeichnung	LXS _N	LXS _N + FCS/Ca ²⁺	HPV16E6	4.Lysat	5.Lysat
A07d	Vorläufer des Tyrosin-Protein Kinase-Rezeptor UFO, AXL-Onkogens	-	-	↑	X	X
A09l	Cyclin-abhängige Kinase-Inhibitor 1, p21, WAF1	-	-	↓	X	X
A14a	Cadherin 1 (CDH1), Vorläufer des epithelialen Cadherins (E-Cadherin)	-	-	↓	X	X
B07l	Plazentales Kalzium-bindendes Protein, Calvasculin, S100A4, MTS1 Protein	-	↓	↓	X	X
B08h	PTPCAAX1 nukleäre Tyrosin Phosphatase (PRL-1)	-	↓	↓	X	X
B11j	RhoHP1	-	↑	↓	X	X
C13k	Interferon-Regulatorischer Faktor 6 (IRF6)	-	↑	↓	*	X
F9h	TRAM-Protein	-	-	↓	X	X
F12f	Typ II zytoskelettäres 2 epidermales Keratin (KRT2E), Zytokeratin 2E	-	-	↓	X	X

Tab. 3/4

Ergebnisse der optischen Auswertung der ATLASTM-cDNAs. Der Bezugspunkt des Vergleiches war die Expressionsstärke des Gens in den unbehandelten Kontrollzellen (LXS_N). Die Probe HPV16E6+FCS/Ca²⁺ wurde bei der optischen Auswertung nicht berücksichtigt.

(-) = unveränderte Expressionsstärke, (↑) = erhöhte Expression, (↓) = schwächere Expression.

(X) Expressionsmuster beobachtet, (*) Expressionsmuster nicht beobachtet.

3.2.2 Die densitometrische Auswertung der ATLASTM-cDNA-Arrays

Mit der Software ATLASImageTM-1.0, die Clontech eigens für die densitometrische Auswertung der cDNA-Arrays entwickelte, wurden die Unterschiede der identifizierten neun

cDNAs semiquantifiziert. Da das Dateiformat der Phosphorimagerauswertungen nicht mit dieser ersten Generation der Clontech-Software kompatibel war, wurden die Expressionsstärken der Gene mit eingescannten Röntgenfilmen ermittelt.

Die Expressionsstärken innerhalb der neun durch die optische Auswertung identifizierten cDNAs waren sehr unterschiedlich. Deshalb wurden jeweils die Röntgenfilme für die Semiquantifizierung benutzt, die für das spezielle Gen weder über- noch unterexponiert waren und so eine Quantifizierung zuließen. Die Ergebnisse der Semiquantifizierung der Gene sind in den Abb. 3/4 und 3/5 dargestellt.

In 3 von 8 Fällen der in beiden Infektionen differentiell exprimierten cDNAs stimmte die Semiquantifizierung mit den Ergebnissen der optischen Auswertung für die 4. und 5. Infektion sehr gut überein (100%). Die Semiquantifizierung einiger Gene (A07d, A09l, F09h, F12f), die bei der optischen Auswertung als nicht differenzierungsrelevant identifiziert wurden, zeigte, dass diese in Anwesenheit von Differenzierungsfaktoren anders exprimiert wurden. Die durch Differenzierungsfaktoren bedingten Expressionsunterschiede waren jedoch nur gering.

Bei A14a stimmte die Semiquantifizierung der 5. Infektion mit der optischen Auswertung gut überein. Bei der 4. Infektion gab es Abweichungen, was den Vergleich der Proben LXSXN und HPV16E6 betraf. Die densitometrische Auswertung von Gen C13k, welches nur in der 5. Infektion differentiell exprimiert wurde, stimmte mit der optischen Auswertung überein.

Abweichungen zwischen den Ergebnissen der optischen Auswertung und der densitometrischen Auswertung können durch Unzulänglichkeiten bei der densitometrischen Auswertung von Röntgenfilmen zu Stande kommen. Hintergrundprobleme, nicht optimale Expositionszeiten (linearer Bereich der Exposition!) sind nur einige Gründe, die zur Verfälschung der Ergebnisse führen können. Aus der Semiquantifizierung ist jedoch erkennbar, dass sowohl die Art der detektierten Expressionsmuster als auch die Expressionsunterschiede (Faktor 2 bis 4) mit den Ergebnissen der „Differential Display of mRNA“-Untersuchungen harmonisierten.

Bei der Auswertung der ATLASTM-Arrays konnten neue Expressionsmuster detektiert werden, die im „Differential Display of mRNA“ nicht zum Vorschein kamen (Tab. 3/3 und 3/6). Die Expressionsmuster für die einzelnen cDNAs, die durch die ATLASTM-Arrays detektiert wurden, sind in den Diagrammen der Abb. 3/4 und 3/5 angegeben worden.

3.2.3 Die Klonierung der ATLASTM-cDNAs

Die Primerinformationen für die anschließende PCR waren direkt durch Clontech verfügbar. Aus den Schmelztemperaturen der PCR-Primer wurden PCR-Programme entwickelt. Die Optimierung der PCR-Programme hinsichtlich singulärer Bandenbildung erfolgte in 2 – 3 Optimierungsschritten relativ schnell. Die entstandenen singulären PCR-Banden je klonierter cDNA wurden aus dem Agarosegel ausgeschnitten, aufgereinigt und kloniert. 10 Klone wurden wie beim „Differential Display of mRNA“ isoliert. Bei 8 von 9 cDNA waren alle 10 Klone

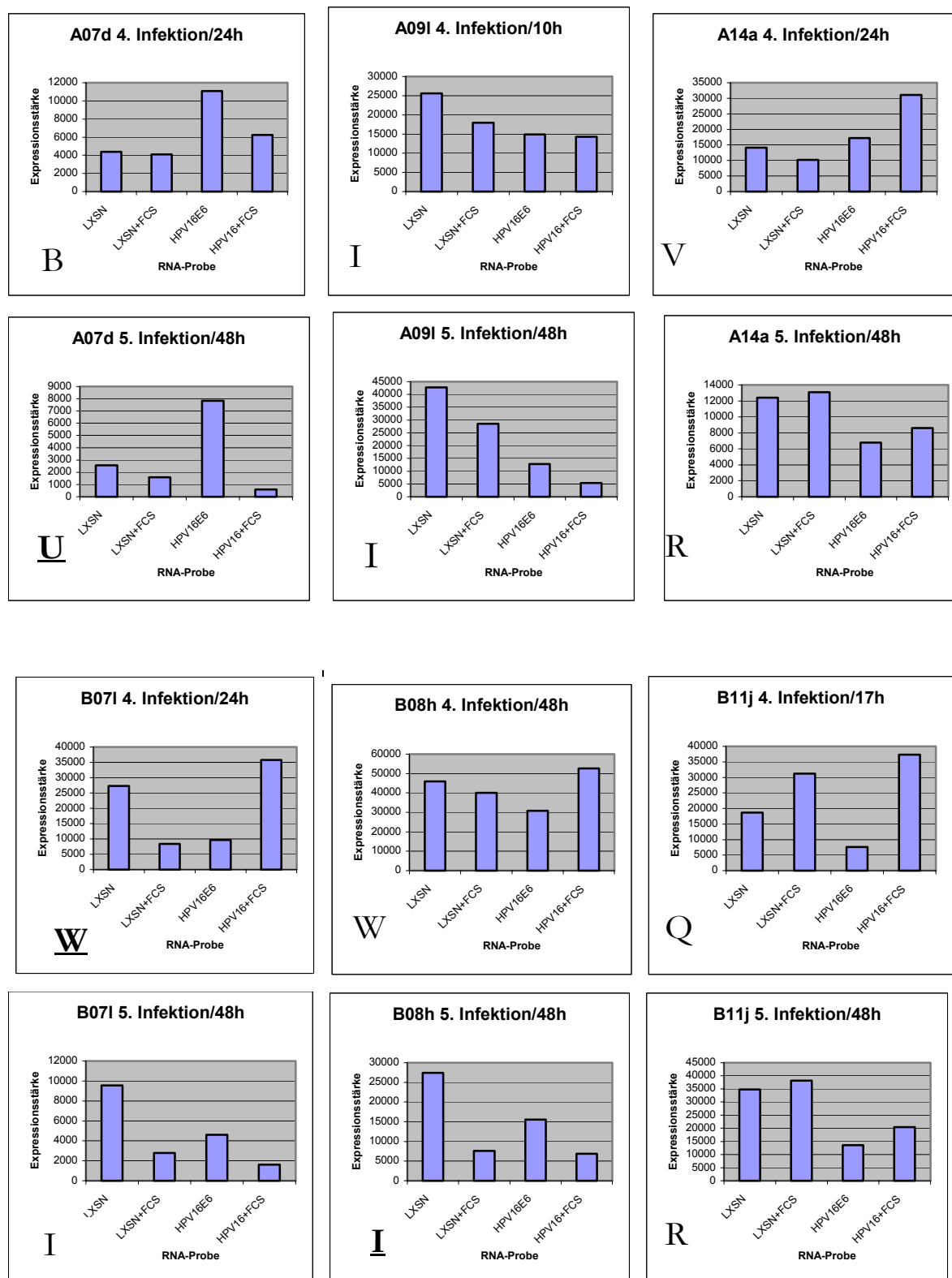


Abb. 3/4

Ergebnisse der Semiquantifizierung der ATLASTM-Array-cDNAs A07d, A09l, A14a, B07l, B08h sowie B11 für die 4. und 5. Infektion mit der Software ATLASImage™ 1.0. Die beobachteten Expressionsmuster sind jeweils links unter den Diagrammen im entsprechenden Buchstabencode angegeben. Die Zeitangabe hinter der Bezeichnung der untersuchten cDNAs stellt die Expositionszeit des eingescannten und vermessenen Röntgenfilms dar.

identisch. Nur bei einem der neun Klone (B11j) waren zwei unterschiedliche cDNA-Spezies vertreten. Durch Sequenzierung konnte für alle ATLASTM-Array-cDNAs gezeigt werden, dass die richtigen Sequenzen kloniert wurden. Für jede klonierte cDNA wurde eine Glycerindauerkultur für weitere Arbeiten angelegt.

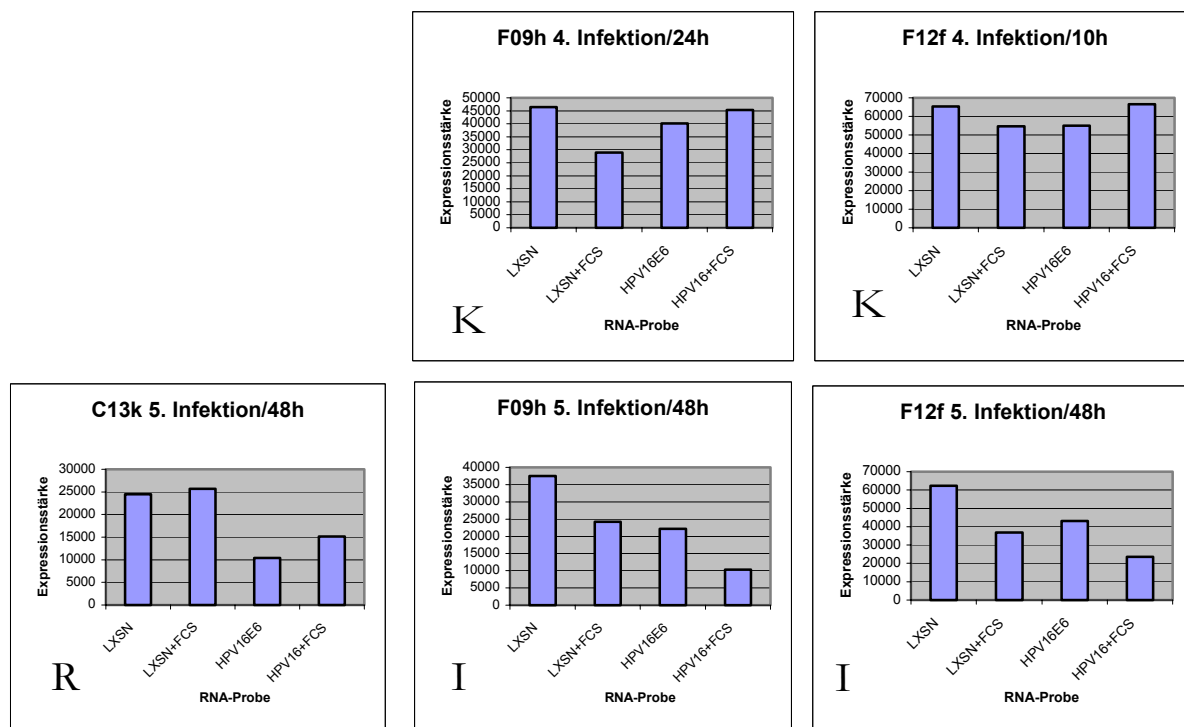


Abb. 3/5

Ergebnisse der Semiquantifizierung der ATLASTM-Array-cDNAs C13k, F09h sowie für die 4. und 5. Infektion mit der Software ATLASImageTM 1.0. Die beobachteten Expressionsmuster sind jeweils links unter den Diagrammen im entsprechenden Buchstabencode angegeben. Die Zeitangabe hinter der Bezeichnung der untersuchten cDNAs stellt die Expositionszeit des eingescannten und vermessenen Röntgenfilmes dar.

3.3 Primäre Verifikation der differentiellen Genexpression mit Reversen-Northern-Blots

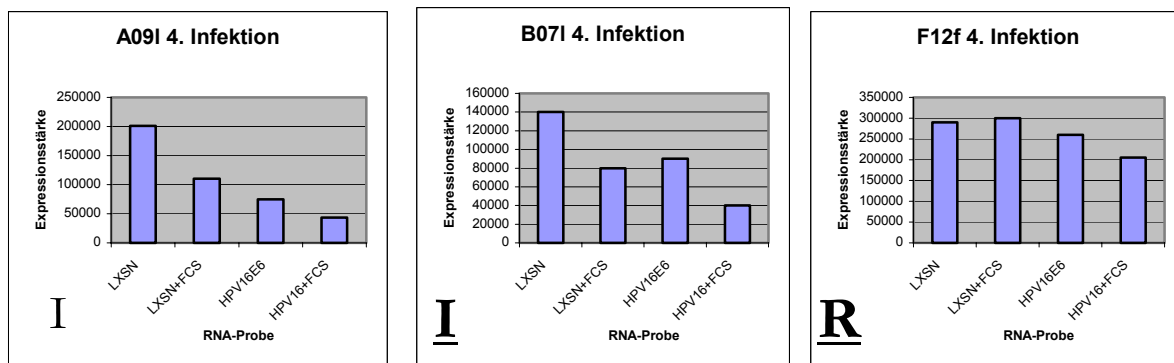
3.3.1 HPV16E6-regulierte cDNAs als Positivkontrollen

Da sich die kleinen RNA-Mengen je Transduktionsexperiment als Hauptproblem für die Verifizierung der „Differential Display of mRNA“-Ergebnisse erwiesen, wurden innerhalb dieser Arbeit Protokolle für eine primäre Verifizierung mit Hilfe des Reversen-Northern-Blots entwickelt und optimiert (Pkt. 2.5).

Alle Reversen-Northern-Blots wurden mit den vier Vergleichsproben (LXS, LXS+FCS/ Ca^{2+} , HPV16E6 und HPV16E6+FCS/ Ca^{2+}) der 4. Infektion durchgeführt. Um die Qualität der Reversen-Northern-Blots zu überprüfen, wurden die durch die ATLASTM-cDNA-Arrays identifizierten Klone als Positivkontrollen verwendet. Ein Filterset, bestehend aus vier Filtern, auf denen die neun ATLASTM-cDNAs aufgespottet waren, wurde hergestellt und mit

den vier Vergleichsproben (LXSN, LXSN+FCS/ Ca^{2+} , HPV16E6 und HPV16E6+FCS/ Ca^{2+}) der 4. Infektion hybridisiert. Die Filter wurden mit dem Phosphorimager vermessen und die Expressionsstärken nach der in Pkt. 2.5.2.6 aufgeführten Berechnung ermittelt.

Reverser-Northern-Blot



Konventioneller Northern-Blot

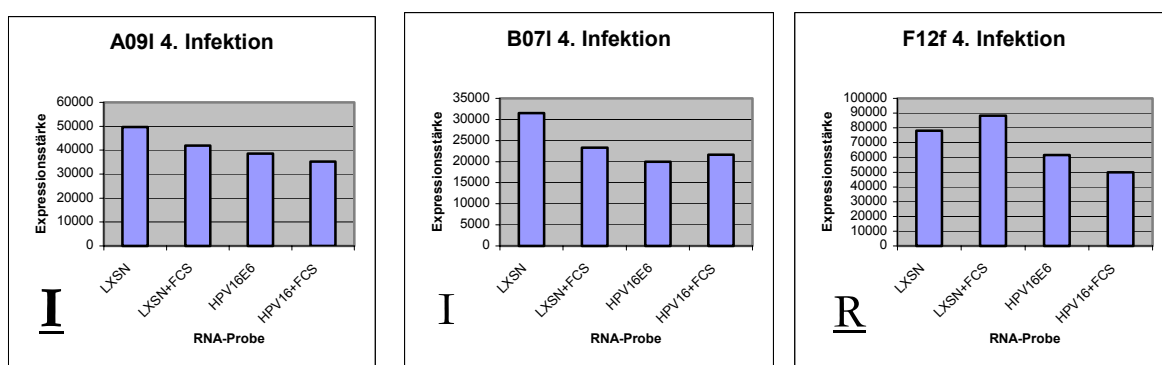


Abb. 3/6

Vergleich der densitometrische Auswertung der ATLASTM-cDNA Hybridisierungsergebnisse von Reversen-Northern-Blot und konventionellen Northern-Blot für A09I 1.K. (siehe Abb. 3/13 oben), B07I 1.K. (siehe Abb. 3/13 unten) und F12f 1.K. (siehe Abb. 3/14 unten). Die beobachteten Expressionsmuster sind als große Buchstaben links unterhalb des jeweiligen Diagramms angegeben (Erläuterung Tab. 3/3 und 3/6).

Nur drei der neun ATLASTM-cDNAs konnten mit dem Phosphorimager quantifiziert werden, die sechs restlichen erbrachten mit dem verwendeten Hybridisierungsprotokoll nur sehr schwache Signale und wurden daher nicht quantifiziert. Überraschenderweise stimmten die Ergebnisse der Quantifizierung nicht aller ATLASTM-cDNAs mit den Ergebnissen der Hybridisierung der cDNA-Arrays überein, obwohl es sich bei beiden Hybridisierungsexperimenten um die gleichen Ausgangsproben handelte. Nur bei A09I (1.Klon) gab es eine 100 %ige Übereinstimmung. Bei den F12f (1.Klon) und B07I (1.Klon) gab es jeweils nur eine 75 %ige Übereinstimmung. Bei beiden wich der erhaltene Reverse-Northern-Blot-Wert für die vierte Vergleichsprobe (HPV16E6+FCS/ Ca^{2+}) stark von dem Wert für die ATLASTM-Arrays ab. Aus diesem Grund

wurden für diese drei cDNAs und so weit wie möglich für weitere ATLASTM-Array-cDNAs konventionelle Northern-Blot-Hybridisierungen durchgeführt. Diese wurden ebenfalls mit dem Phosphorimager quantifiziert.

Alle drei schon im Reversen-Northern-Blot ausgewerteten cDNAs zeigten eine 100 %ige Übereinstimmung mit den Ergebnissen des konventionellen Northern-Blots. Die Hybridisierungsergebnisse sind in Abb. 3/6 dargestellt. Aufgrund dieser Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass der Reverse-Northern-Blot für die primäre Verifikation eingesetzt werden konnte.

3.3.2 Identifizierung der weiter bearbeiteten „Differential Display of mRNA“-cDNA-Klone

Nachdem gezeigt wurde, dass der Reverse-Northern-Blot prinzipiell funktioniert, wurden die 200 über das „Differential Display of mRNA“ generierten cDNA-Klone überprüft. Für über ein Viertel aller Klone konnte gezeigt werden, dass sie durch HPV16E6 reguliert wurden. Es konnten zusätzliche Expressionsmuster, die im „Differential Display of mRNA“ nicht detektiert wurden, beobachtet werden. Diese Muster sind in Tab. 3/6 zusammengestellt.

Mindestens 50 % der Klone konnten nicht verifiziert werden, weil die Hybridisierungssignale für eine Semiquantifizierung zu schwach waren. Die verifizierten „Differential Display of mRNA“-Klone wurden für weitere Untersuchungen zusammengestellt und sequenziert. Die Sequenzierungsergebnisse sind in Tab. 3/5 aufgeführt. Die vollständigen Sequenzen der klonierten cDNAs sind in unter Pkt. 6.1 im Anhang zusammengestellt.

Tab. 3/5 Sequenzierungsergebnisse und Expressionsmuster im Reversen-Northern-Blot der HPV16E6 differentiell exprimierten "Differential Display of mRNA"-cDNAs

Nr.	Klon	Exp.-muster	Insert	Sequenzvergleich in NCBI-Blast	Accession-Nr.	Homologie	vgl. Bereich (Orientierung)
1	C2 1.K.	I	502 bp	Homo sapiens P/OKcl.4 mRNA for 2'-5' oligoadenylate synthetase 3	AB044545.1	99%	168-501 (U)
2	N1 1.K.	Q	262 bp	Homo sapiens similar to NS1-associated protein 1 (H. sapiens),	XM 004340.3	100%	21-142 (R)
3	Q1 1.K.	H	544 bp	Homo sapiens chromosome 17, clone hRPC.1164_o-3	AC004703.1	100%	136 - 394 (U)
4	Q1 2.K.	I	444 bp	Mitochondriales Gen: tRNAPro - D-Loop	NC 001807.3	99%	4 -443 (R)
5	Q6 1.K.	I	261 bp	Homo sapiens calbindin 2, (29kD, calretinin) (CALB2), transcript	NM 001740.2	100%	1 -257 (R)
6	Q6* 1.K.	I	264 bp	mitochondriale tRNAs: Ala, Asn	AF34015.1	100%	2 - 164 (R)
7	S1 5.K.	I	362 bp	Homo sapiens microtubule-interacting protein that associates with TRAF3; DKFZP434F124 protein (DKFZP434F124), mRNA Homo sapiens MIP-T3 mRNA, complete cds	NM 015650.1 AF230877.1	99% 99%	1-359 (R) 1-359 (R)
8	S1 10.K.	Q	361 bp	Homo sapiens kallikrein 10 (KLK10), mRNA	XM 009004.3	99%	1- 353 (R)
9	S2 1.K.	F	252 bp	Homo sapiens, Similar to ribosomal protein S6, clone MGC:8597, mRNA, complete cds Homo sapiens ribosomal protein S6 (RPS6), mRNA	BC000524.1 XM 015349.1	99% 99%	1-252 (R) 1-252 (R)
10	S3 1.K.	Y	156 bp	mitochondriales Gen: NADH Dehydrogenase Subunit 2	AF347015.1	100%	5-155 (R)
11	T1 3.K.	I	345 bp	mitochondriales Gen: Cytochrome oxidase Subunit 1+ tRNA-Ser	AF347015.1	99%	4 - 344 (R)
12	U5 6.K.	K	351 bp	Homo sapiens coagulation factor III (thromboplastin, tissue factor) (F3), mRNA	XM 001322.1	99%	1-351 (U)
13	12/3 1.K.	I	214 bp	Homo sapiens mitochondrion, complete genome	AF347015.1	99%	2-214 (R)
14	22/1 4.K.	C	263 bp	Homo sapiens sterol-C4-methyl oxidase-like (SC4MOL), mRNA	XM 003480.2	96%	8-262 (R)
15	22/3 1.K.	I	214 bp	Homo sapiens p45SKP2-like protein mRNA, complete cds	AF157323.1	98%	70 - 210 (R)
16	23/1 3.Klon	I	411 bp	FK506 binding Protein	BC001925.1	94%	4-411 (R)
17	24A/1 10. K.	C	452 bp	Homo sapiens inorganic pyrophosphatase 1 (PPA1) mRNA, complete cds	AF217186.1	100%	1 - 383 (R)

18	24B/1 1.K.	I	245 bp	Homo sapiens laminin, gamma 2 (nicein (100kD), kalinin (105kD), BM600 (100kD), Herlitz junctional epidermolysis bullosa) (LAMC2), mRNA	XM 002202.3	100%	5 - 51 (R) und 116 - 244 (R)
19	33/1 4.K.	I	424 bp	Homo sapiens, similar to protein phosphatase 1 G (formerly 2 C)	BC 007531.1	97%	1 - 411 (R)
20	33/5 1.K.	V	197 bp	Homo sapiens, calmodulin 2 (phosphorylase kinase, delta), clone MGC:5226, mRNA, complete cds	BC003354.1	95%	21 - 194 (R)
21	33/6 1.K.	V	198 bp	Homo sapiens, calmodulin 2 (phosphorylase kinase, delta), clone MGC:2168, mRNA, complete cds	BC006464.1	95%	22 - 195 (R)
22	36/1 3.K.	I	317 bp	16S ribosomal RNA (mitochondrial)	AF347015.1	99%	28 - 340 (R)
23	36/1 4.K.	C	310 bp	Homo sapiens, actin, gamma 1, clone MGC: 4484	BC007442.1	97%	2 - 309 (R)
24	36/3 2.K.	Q	288 bp	Homo sapiens kallikrein 5 (KLK5), mRNA	XM 009000.3	100%	50-232 (R)
25	44/1 1.K.	I	395 bp	tRNA Pro + D-Loop (mitochondrial)	NC 001807.3	98%	2- 390 (R)
26	44/1 4.K.	U	376 bp	mitochondrial: tRNA Pro + D-Loop	AF347015.1	97%	4 - 316 (R)
27	44A/1* 1.K.	E	496 bp	tRNA Pro + D-Loop (mitochondrial)	AF 346981.1	98%	109 - 496 (R)
28	44B/1* 4.K.	U	323 bp	Human DNA sequence from clone RP4-591C20 on chromosome 20 Contains ESTs, STSs, GSSs and CpG islands. Contains a novel gene for a protein similar to mouse NG26, the TPD52L2 gene for three isoforms of tumor protein D52-like protein 2, a gene for a novel >	AL118506.27	99%	1 - 317 (R)
29	44/2 1.K.	U	221 bp	mitochondriales Gen: 16 S ribosomale RNA Humanin	AF347015.1	99%	3- 216 (R)
30	44/2 3.K.	U	222 bp	Homo sapiens Humanin (HN1) mRNA, complete cds mitochondriales Gen: 16 S r RNA	AY029066.1 AF347015.1	98% 98%	3-217 (R) 3 - 217 (R)
31	44/2* 4.K.	I	223 bp	Homo sapiens hypothetical protein FLJ23476 (FLJ23476), mRNA	XM 016401.1	100%	3 - 216 (R)
32	44/3 1.K.	W	138 bp	Homo sapiens, cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1), clone MGC:4059, mRNA, complete cds	BC001935.1	100%	6 - 131 (R)
33	46/4 1.K.	I	452 bp	Homo sapiens inorganic pyrophosphatase 1 (PPA1) mRNA, complete cds	AF217186.1	100%	1 - 382 (R)
34	46/4 4.K.	S	184 bp	Homo sapiens IDL RNA, complete sequence; mitochondrial gene for mitochondrial product	AF079515.1	100%	4- 184 (R)

35	46/5 6.K.	A	193 bp	Homo sapiens genomic DNA, chromosome 8q23, clone: KB2021C9	AP003475.2	100%	4 - 174 (R)
36	47/2 1.K.	I	344 bp	Homo sapiens calpastatin (CAST), mRNA Length = 1767	XM 003978.3	99%	1 - 338 (R)
37	47/3 2.K.	Q	286 bp	Homo sapiens PAC clone RP5-901A4, complete sequence	AC004923.2	95% 93%	4- 173 (R) und 204-284 (R)
38	47/3 4.K.	U	285 bp	mitochondriales Gen: NADH Dehydrogenase Subunit 5	AF347015.1	97%	3 - 282 (R)
39	47/4 1.Klon	Y	166 bp	mitochondriales Gen: 16 S r RNA	AF347002.1	100%	4 - 164 (R)
40	47/5 1.K.	U	136 bp	Homo sapiens, interferon induced transmembrane protein 1 (9-27), clone MGC:5195, mRNA, complete cds	BC000897.1	98%	2 - 131 (R)
41	47/5 4.K.	S	138 bp	Human DNA sequence from clone RP11-27F12 on chromosome 6p22.3-24. Contains STSs and GSSs, complete sequence [Homo sapiens]	AL109914.16	92%	15 - 105 (R)
42	48/1 1.K.	U	402 bp	Cytochrome Oxidase Subunit 1 + t-RNA Ser (mitochondrial)	AF347015.1	94%	97 - 402 (R)
43	48/1 7.K.	U	311 bp	12Sribosomale RNA	NC 001807.3	99%	137 - 299 (U)
44	48/2 4.K.	I	106 bp	keine Homologie gefunden			
45	48/2* 4.K.	T	104 bp	Homo sapiens cDNA FLJ10761 fis, clone NT2RP3004669, weakly similar to ETHANOLAMINE KINASE (EC 2.7.1.82)	AK0011623.1	98%	2 - 104 (R)
46	53/3 1.K.	I	126 bp	Homo sapiens chromosome 15 clone RP11-64K12 map 15q14, complete sequence	AC013356.8	96%	3 - 122 (R)
47	54/1* 2.K.	B	546 bp	Homo sapiens desmocollin 3 (DSC3), transcript variant Dsc3b, mRNA	NM 024423.1	100%	1 - 537 (U)
48	54/1* 3.K.	T	419 bp	Homo sapiens BAC clone RP11-127K18 from 2	AC010134.4	98%	51 - 419 (U)
49	54/2* 2.K.	I	215 bp	Homo sapiens ST5 gene for suppression of tumorigenicity 5, L27a gene for ribosomal protein L27a and KIAA0298 gene	NM 000990.2	96%	10 -211 (R)
50	54/2* 5.K.	I	230 bp	Homo sapiens BAC clone RP11-504O20 from 2, complete sequence	AC016751.7	100%	15 - 226 (R)
51	54/3* 3.K.	H	174 bp	Human S protein mRNA, complete cds	L20815.1	96%	1 - 165 (R)
52	54/3 9.K.	T	171 bp	Homo sapiens chromosome X sequence from BAC CEPHB328P12 map Xq13 region PHKA1-DXS227, complete sequence	AL133500.3	100%	1 - 159 (R)
53	55/3 1.K.	T	105 bp	Human DNA sequence from clone RP3-322I12 on chromosome 6p21.1-21.31. Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp761C082 (from clone DKFZp761C082)	AL033518.14 AL157476.1	100% 100%	1 - 102 (R) 1 - 102 (R)

Expressionsmuster (vereinfacht)				Kurzbezeichnung	Expressionsstärken
LXSN	LXSN +FCS/Ca ²⁺	HPV16E6	HPV16E6 +FCS/Ca ²⁺		
–	–	–	–	P	LXSN=LXSN+FCS/Ca ²⁺ LXSN=HPV16E6 LXSN=HPV16E6+FCS/Ca ²⁺
–	↑	↓	↑	Q	LXSN<LXSN+FCS/Ca ²⁺ LXSN>HPV16E6 LXSN>HPV16E6+FCS/Ca ²⁺
–	↑	↓	↓	R	LXSN<LXSN+FCS/Ca ²⁺ LXSN>HPV16E6 LXSN>HPV16E6+FCS/Ca ²⁺
–	↑	↓	–	S	LXSN<LXSN+FCS/Ca ²⁺ LXSN>HPV16E6 LXSN=HPV16E6+FCS/Ca ²⁺
–	↓	↑	–	T	LXSN>LXSN+FCS/Ca ²⁺ LXSN<HPV16E6 LXSN=HPV16E6+FCS/Ca ²⁺
–	↓	↑	↓	U	LXSN<LXSN+FCS/Ca ²⁺ LXSN>HPV16E6 LXSN<HPV16E6+FCS/Ca ²⁺
–	↓	↑	↑	V	LXSN>LXSN+FCS/Ca ²⁺ LXSN<HPV16E6 LXSN<HPV16E6+FCS/Ca ²⁺
–	↓	↓	↑	W	LXSN<LXSN+FCS/Ca ²⁺ LXSN<HPV16E6 LXSN>HPV16E6+FCS/Ca ²⁺
–	↑	–	↑↑	X	LXSN<LXSN+FCS/Ca ²⁺ LXSN=HPV16E6 LXSN<HPV16E6+FCS/Ca ²⁺ LXSN+FCS/Ca ²⁺ < HPV16E6+FCS/Ca ²⁺
–	↓	–	↓↓	Y	LXSN>LXSN+FCS/Ca ²⁺ LXSN=HPV16E6 LXSN>HPV16E6+FCS/Ca ²⁺ LXSN+FCS/Ca ²⁺ >HPV16E6+FCS/Ca ²⁺

Tab. 3/6

Darstellung der neuen, bei der Reversen-Northern-Blot-Hybridisierung (und den ATLAS™-Arrays) beobachteten Expressionsmuster (siehe Tab. 3/3)

3.4 Sekundäre Verifikation der differentiellen Genexpression mit Hilfe konventioneller Northern-Blot-Hybridisierung

3.4.1 Northern-Blot-Hybridisierung ausgewählter „Differential of mRNA“-Klone

53 klonierte cDNAs, welche durch das Verfahren des „Differential Display of mRNA“ identifiziert worden sind, konnten durch die primäre Verifikation mit Hilfe des Reversen-Northern-Blots verifiziert werden. Nach Sequenzierung der identifizierten „Differential Display of mRNA“-Klone wurde deutlich, dass es sich sowohl um nukleär chromosomal kodierte zelluläre Gene handelte, als auch um Gene, welche durch das mitochondriale Genom verschlüsselt sind.

Mit den Resten der RNA der 4. Infektion sowie mit der neu bereitgestellten RNA der 6. und 7. Infektion wurden Northern-Blot-Hybridisierungen durchgeführt. Mit diesen war es zusätzlich möglich, die durch HPV16E6-bedingte differentielle Genexpression zu untermauern.

Gleichzeitig konnten Aussagen über Transkriptgröße und -anzahl getroffen werden. Als Kontrollhybridisierungsprobe wurde β -Aktin verwendet.

Insgesamt konnten 6 Hybridisierungen mit RNA der 4. Infektion, 22 mit RNA der 6. Infektion sowie 28 mit RNA der 7. Infektion durchgeführt werden. Die beobachteten Expressionsmuster der bearbeiteten Klone sind in Tab. 6/1 des Anhangs zusammengestellt.

3.4.1.1 Northern-Blot-Hybridisierungs-Ergebnisse ausgewählter „Differential Display of mRNA“-Klone nukleär kodierter Gene

Bei den durchgeführten Northern-Blot-Hybridisierungen mit den differentiell exprimierten „Differential Display of mRNA“-Klonen traten ebenfalls die unterschiedlichen Expressionsmuster auf, die bereits im „Differential Display of mRNA“ und im Reversen-Northern-Blot beobachtet werden konnten (Tab. 3/3 und 3/6).

Besonders interessant waren die Hybridisierungsergebnisse mit RNA der 4. Infektion, da hier neben den RNA-Proben LXS_N, LXS_N+FCS/Ca²⁺, HPV16E6 sowie HPV16E6+FCS/Ca²⁺ noch RNA HPV6E6-transduzierter Keratinozyten (E6-Protein des LR-HPV-Typs 6) mit und ohne Zugabe von Differenzierungsfaktoren zur Verfügung standen (Probenbezeichnung: HPV6E6 und HPV6E6+FCS/Ca²⁺). Es konnten Expressionsmuster beobachtet werden, in denen die Genexpressionen für HPV16 und HPV6 relativ ähnlich waren, sich jedoch in den Expressionsstärken unterschieden (z.B. C2 1.Klon Abb. 3/7 oben). Es konnten jedoch auch cDNAs detektiert werden, die nach Transduktion des HPV16E6-Onkogens in Keratinozyten anders exprimiert wurden als nach Transduktion von HPV6E6. Vertreter der letztgenannten Gruppe dürften als zukünftige Progressionsmarker für das Zervixkarzinom von größtem Interesse sein. Zu diesen gehören die abgebildeten cDNAs U5 6.Klon (Abb. 3/7 unten), 23/1 3.Klon (Abb. 3/8 oben) sowie 24B/1 1.Klon (Abb. 3/8 unten).

<u>Klon</u>	<u>Sequenz</u>
C2 1.K.	Homo sapiens P/Okl.4 mRNA for 2'-5' oligoadenylate synthetase 3
S1 5.K.	MIP-T3
S1 10.K.	Homo sapiens kallikrein 10
U5 6.K.	Homo sapiens coagulations factor III (thromboplastin, tissue factor)
23/1 3.K.	FK506 binding protein
24B/1 1.K.	Homo sapiens laminin, gamma 2

Tab. 3/7

cDNA-Klone, deren Northern-Blot-Hybridisierungsergebnisse in den Abb. 3/7 – 3/10 dargestellt sind.

Nach Vergleich der bisher mit Hilfe des „Differential Display of mRNA“, der Reversen-Northern-Blot-Hybridisierungen sowie der konventionellen Northern-Blot-Hybridisierungen gewonnenen Daten konnte kein Gen detektiert werden, welches in allen bearbeiteten Infektionen konsistent verändert exprimiert vorlag. Zwar konnte bei den meisten die differentielle

Genexpression durch HPV16E6 gezeigt werden, die Expressionsmuster unterschieden sich jedoch von Infektion zu Infektion.

Dieses Ergebnis bestätigte sich auch bei den Hybridisierungen mit den RNAs der 6. und 7. Infektion. Die in diesen RNAs detektierten Expressionsmuster für eine bestimmte cDNA wichen von dem ermittelten Expressionsmuster der 4. Infektion ab, welches durch konventionellen Northern-Blot oder Reversen-Northern-Blot detektiert wurde. Bei einem alleinigen Vergleich der detektierten Expressionsmuster in der 6. und 7. Infektion konnte man jedoch sehen, dass sich diese Infektionen ähnlicher verhielten, als z.B. die 6. bzw. 7. Infektion im Vergleich zur 4. Infektion. Für die 6. und 7. Infektion gab es Vertreter der „Differential Display of mRNA“-Klone, die in beiden Infektionen das gleiche Expressionsmuster aufwiesen (z.B. S1 5.Klon und S1 10. Klon, Abb. 3/9). Diese Gene wurden somit in Bezug auf Infektion 6. und 7. konsistent exprimiert. Es gab jedoch auch hier Gene, die in diesen beiden Infektionen zwar durch HPV16E6 differentiell exprimiert wurden, sich jedoch als inkonsistent erwiesen (z.B. C2 1.Klon, Abb. 3/10 oben). Ein Beispiel für ein Gen, welches nur in der 6. Infektion differentiell exprimiert wurde, ist 24B/1 1.Klon (Abb. 3/10 unten). Wie schon in der vierten Infektion (Abb. 3/8) konnte hier eindeutig eine differentielle Expression beobachtet werden. Es liegen die in der Literatur beschriebenen Spleißprodukte vor (Airenne et al. 1996), die sowohl in Infektion 4 als auch 6 unterschiedlich stark im Vergleich der vier Proben (LXSN, LXSN+FCS/Ca²⁺, HPV16E6 und HPV16E6+FCS + Ca²⁺) sind. In der 7. Infektion konnten diese beiden oberen Spleißprodukte nicht detektiert werden.

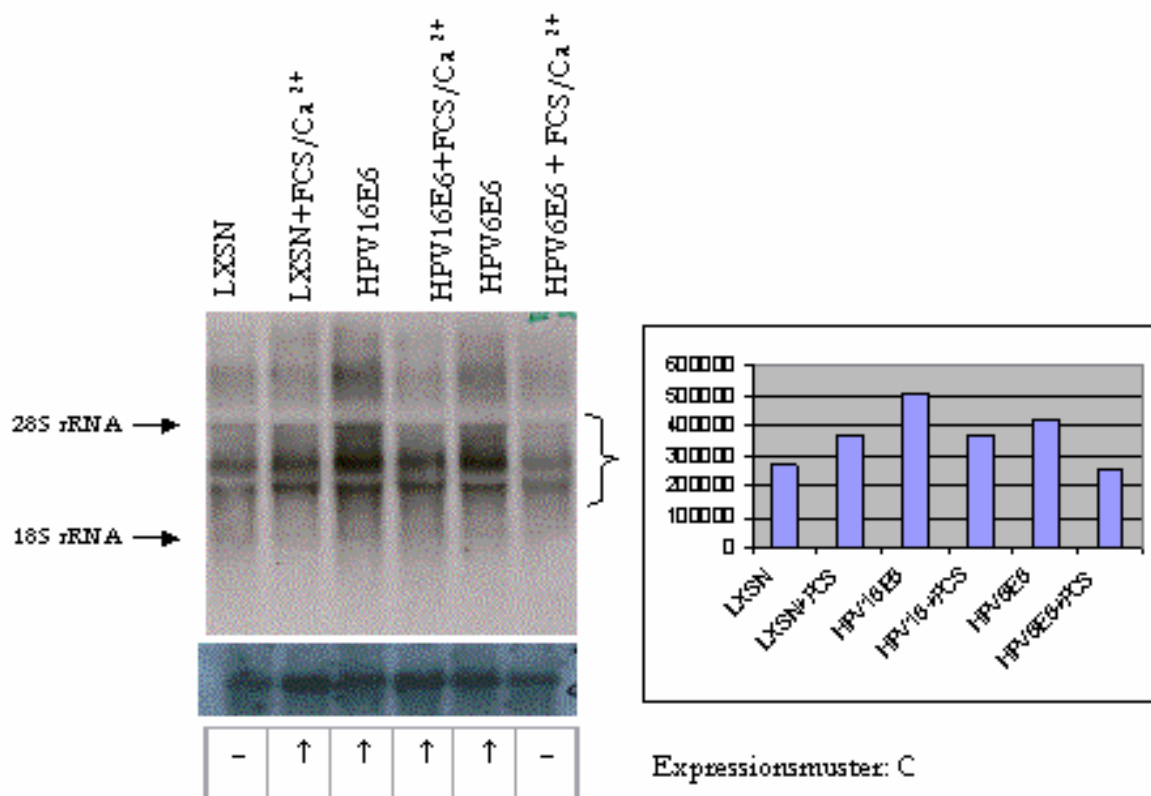
Ein Grund für die höhere Ähnlichkeit der Infektionen 6 und 7 zueinander im Vergleich zu den Infektionen 4 und 5 könnte die unterschiedliche Herkunft sein (Präparation 4. und 5. Infektion = N. Whitaker, Heidelberg; 6. und 7. Infektion = L. Sherman, Tel Aviv). Aber auch der durch den Genotyp des Spenders determinierte individuelle Charakter der Proben könnte ein Grund für die Inkonsistenz der Expressionsmuster sein.

3.4.1.2 Northern-Blot-Hybridisierungs-Ergebnisse ausgewählter “Differential Display of mRNA-Klone” mitochondrial kodierter Gene

Mehrere cDNAs kodierten für mitochondrial kodierte Genprodukte. Mit diesen cDNAs wurden Northern-Hybridisierungen mit RNA der 6. und 7. Infektion vorgenommen. Nach Vergleich der Hybridisierungsergebnisse für alle Klone konnte für 47/3 4. Klon, 48/1 1.Klon, S3 1. Klon sowie für 46/4 4. Klon ein gemeinsames Merkmal detektiert werden. Jeweils die obere Hybridisierungsbande auf ungefährer Höhe der 28S rRNA war in Infektion 6 und 7 bei den Proben LXSN und LXSN+FCS/Ca²⁺ vorhanden, bei den Proben HPV16E6 und HPV16E6+FCS/Ca²⁺ jedoch nicht detektierbar. In der 6. Infektion war diese Bande im Vergleich zur 7. Infektion unabhängig von der eingesetzten Hybridisierungssonde immer stärker ausgeprägt.

Die mitochondriale DNA des Menschen ist ein zirkuläres Genom mit einer Länge von rund 16 kb. Sie kodiert für 13 Proteine, zwei ribosomale RNAs sowie für 22 t-RNAs (Tabak und Arberg, 1986). Die mitochondriale Genomorganisation ist kompakt, mit Ausnahme der Region, die den D-Loop, d.h. die Kontrollregion, kodiert (Tabak und Arberg, 1986). Diese D-Loop-

4. Infektion DD-cDNA C2 1.Klon



4. Infektion DD-cDNA U5 6.Klon

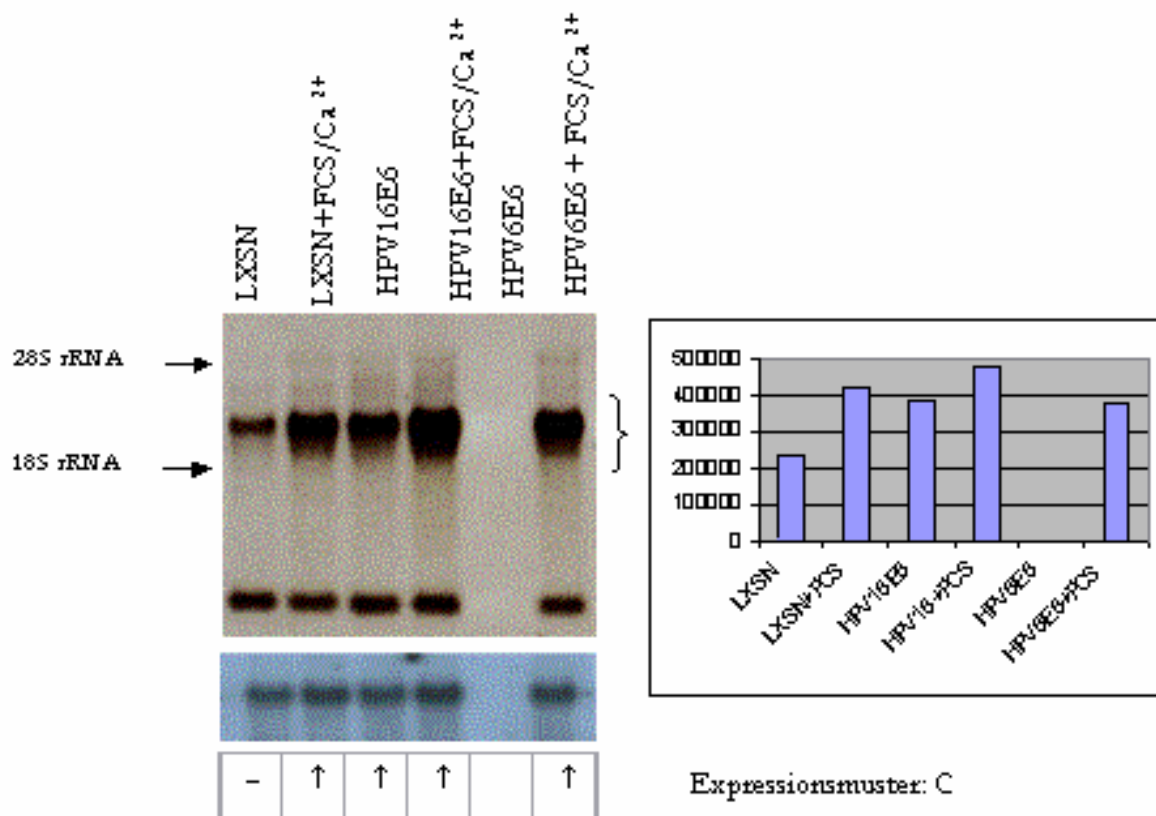
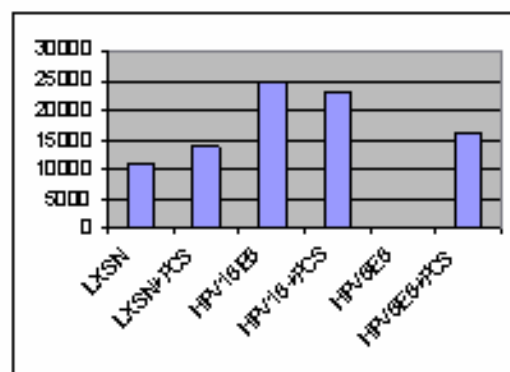
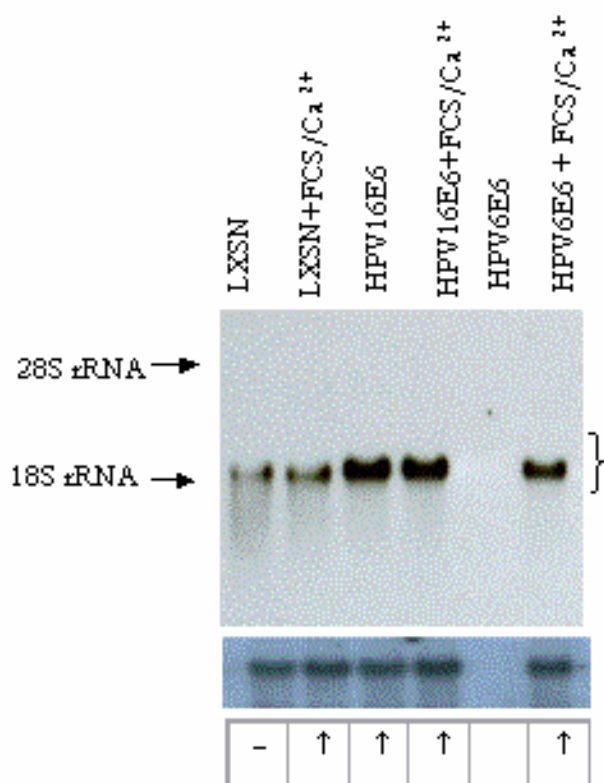


Abb. 3/7 Northern-Blot-Hybridisierungen C2 1.Klon und U5 6.Klon. Die angegebenen Expressionsmuster beziehen sich auf die ersten 4 RNA-Proben.

4. Infektion DD-cDNA 23/1 3.Klon



4. Infektion DD-cDNA 24B/1 1.Klon

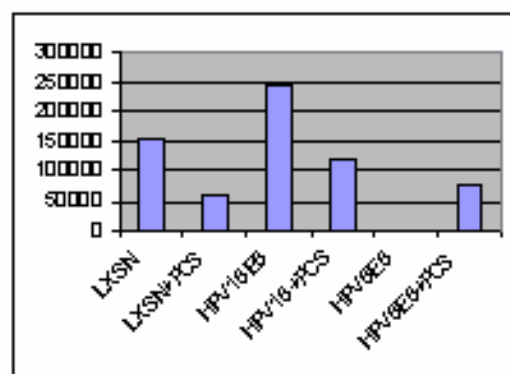
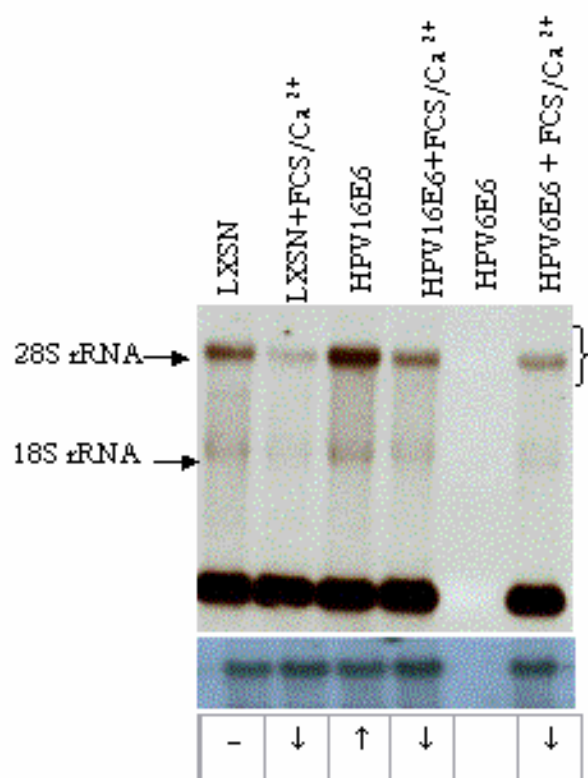
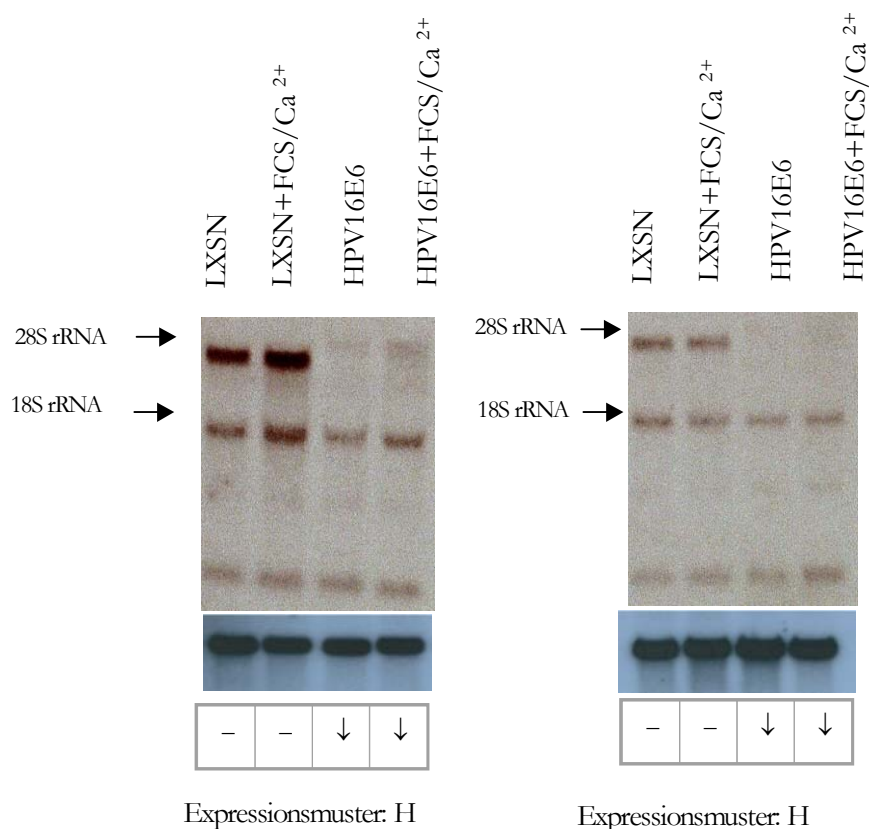


Abb. 3/8 Northern-Blot-Hybridisierungen 23/1 3.Klon und 24B/1 1.Klon. Die angegebenen Expressionsmuster beziehen sich auf die ersten 4 RNA-Proben.

6. und 7. Infektion DD-cDNA S1 5.Klon



6. und 7. Infektion DD-cDNA S1 10.Klon

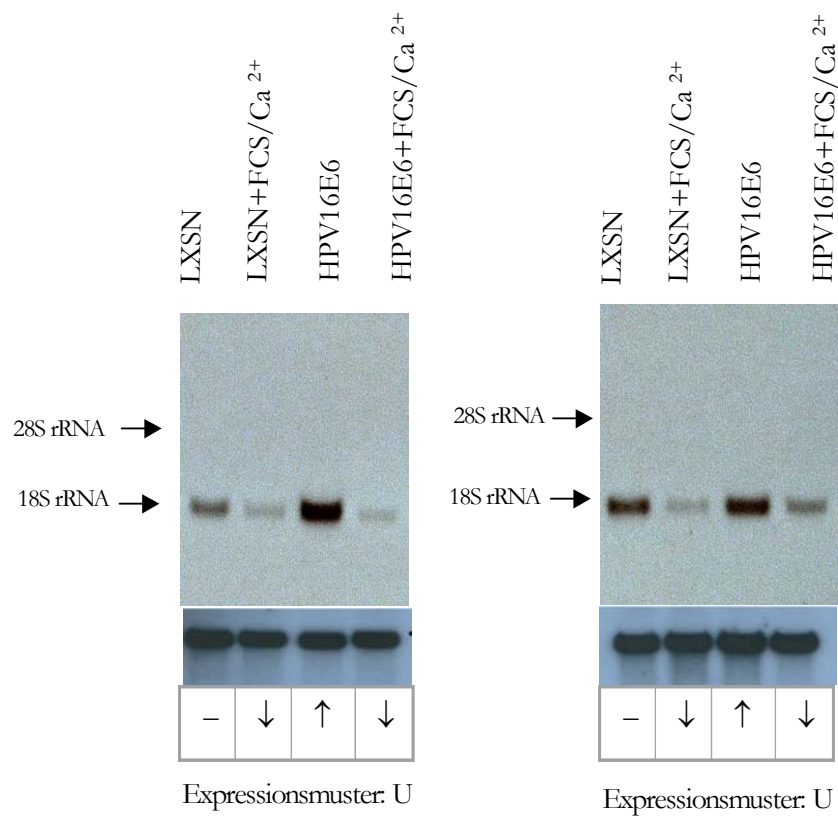
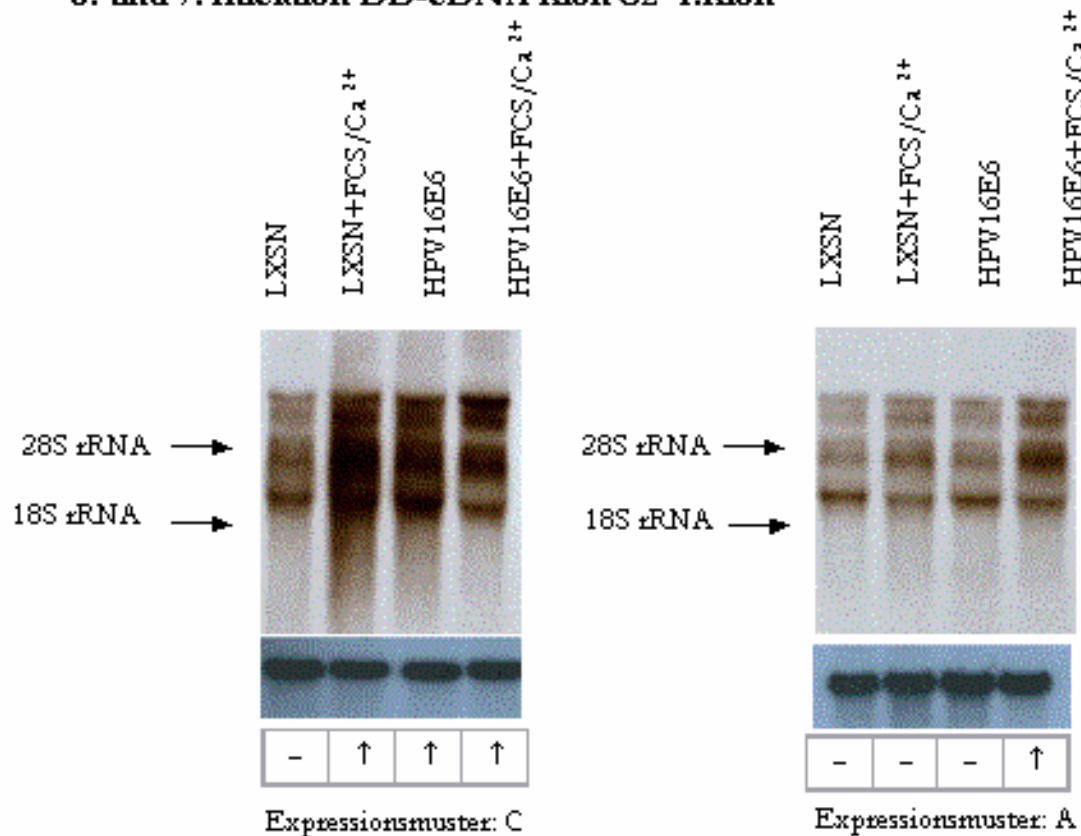


Abb. 3/9 Northern-Blot-Hybridisierungen S1 5.Klon und S1 10. Klon

6. und 7. Infektion DD-cDNA Klon C2 1.Klon



6. und 7. Infektion DD-cDNA 24B/1 1.Klon

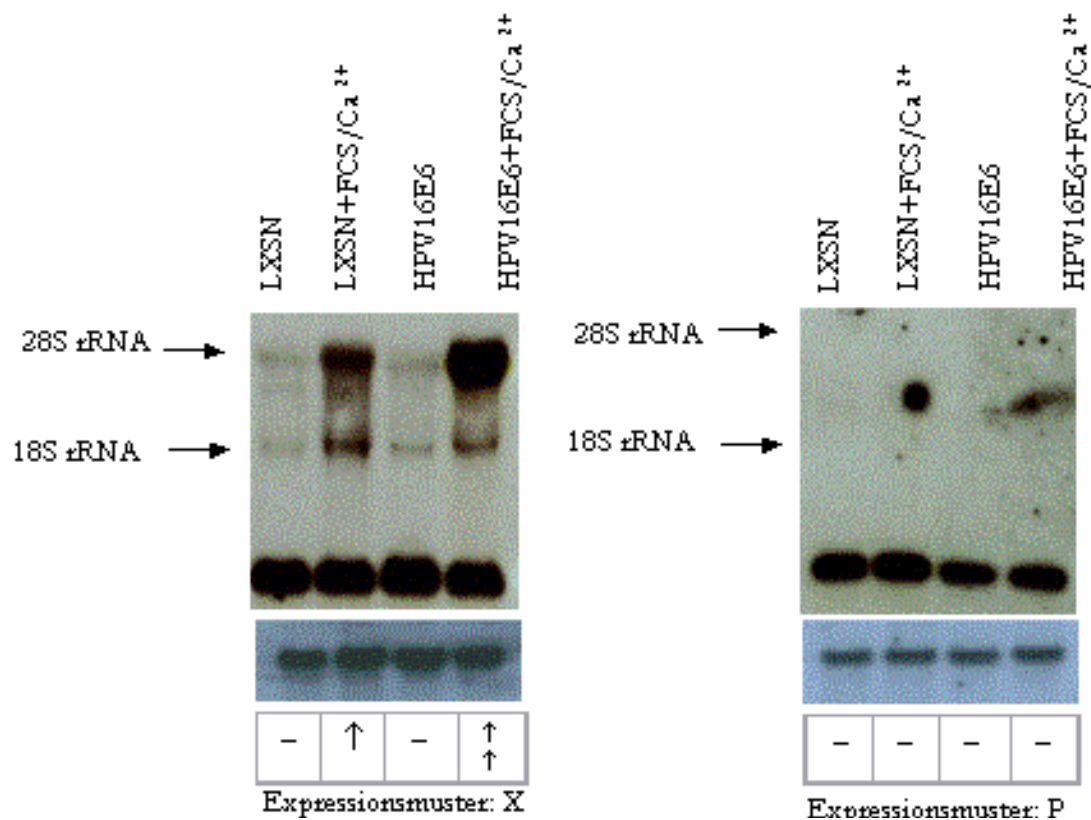


Abb. 3/10 Northern-Blot-Hybridisierungen C2 1.Klon und 24B/1 1.Klon

Region ist in die Initiation der Replikation und der Transkription der mitochondrialen DNA involviert. Beim Menschen werden beide DNA-Stränge transkribiert. Die Stränge werden aufgrund der Anzahl der Gene als leichter Strang und schwerer Strang bezeichnet. Durch den leichten Strang werden nur 8 tRNAs kodiert. Vom schweren Strang des mitochondrialen Genoms werden die mRNAs des mitochondrialen Genoms für alle Proteine und die mitochondrialen ribosomalen RNAs abgelesen. Jeder Strang wird als einfacher polycistronischer, später posttranskriptionell in die einzelnen mRNA prozessierter Strang transkribiert (Tabak und Arnberg, 1986).

Bei der detektierten Hybridisierungsbande, deren Expression durch HPV16E6 unterdrückt wird, handelt es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um das Primärtranskript des schweren Stranges (Abb. 3/11 oben und unten). Um dies zu bestätigen, müssen jedoch weitere Untersuchungen mit spezifischeren Hybridisierungssonden durchgeführt werden.

<u>Klon</u>	<u>Sequenz</u>
S3 1.K.	NADH Dehydrogenase Subunit 2
46/4 4.K.	IDL RNA

Tab. 3/8

cDNA-Klone, deren Northern-Blot-Hybridisierungsergebnisse in der Abb. 3/11 dargestellt sind.

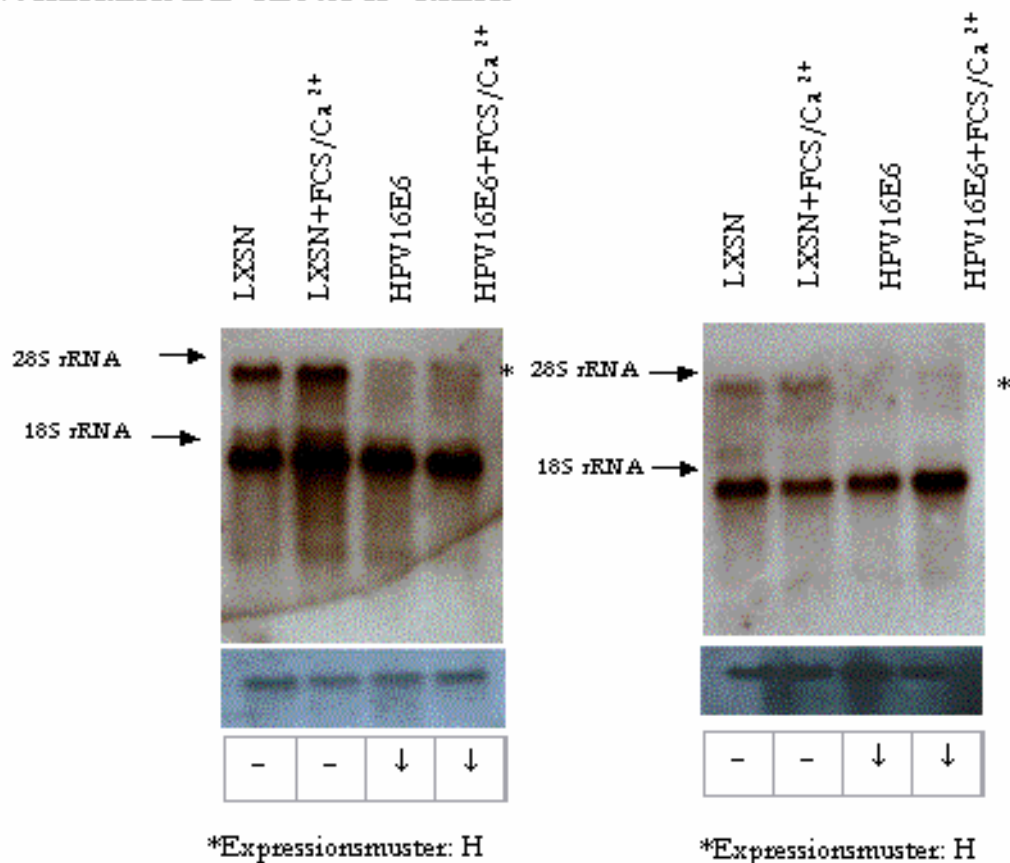
Bei dem Klon 46/4 4.Klon handelt es sich von der Sequenz her um eine mitochondriale Spezies des leichten Stranges, die durch Duncan *et al.* (2000) erstmals beschrieben wurde und durch die Kontrollregion, den D-Loop kodiert wird. Diese RNA wurde in Experimenten von Duncan *et al.* (2000) infolge Immortalisierung hochreguliert. Auffällig bei Klon 46/4 4.Klon ist jedoch, dass die entstandenen Hybridisierungssignale die Transkripte des schweren Stranges detektieren. Aufgrund des Markierungsprotokolls und der Art und Weise, wie die Transkripte des schweren und des leichten Stranges des mitochondrialen Genoms transkribiert werden, ist eine Unterscheidung von Transkripten des schweren und des leichten Stranges nicht möglich. Hierzu müssten spezifische Primer verwendet werden, die eine radioaktive Markierung nur eines Stranges der Sonde zulassen.

Die Ergebnisse der Hybridisierungen mit den mitochondrial kodierten Klonen zeigten eindeutig, dass es in den Mitochondrien der HPV16E6-transduzierten Keratinozyten zu gewaltigen Veränderungen hinsichtlich der Transkription kam.

3.4.2 Verifikation der ATLASTM-Array Ergebnisse mittels konventioneller Northern-Blots

Neben den für den Nachweis der Einsatzfähigkeit des Reversen-Northern-Blots benötigten drei konventionellen Northern-Blot-Hybridisierungen mit ATLASTM-Klonen (A09l 1.K., B07d 1.K. und F12f 1.K.) (vgl. Pkt. 3.3.1) wurden, soweit möglich, weitere Klone mit RNA der 4. und 5. Infektion hybridisiert. Auch hier waren kleinere Abweichungen von den ATLASTM-cDNA-Array-Ergebnissen beobachtbar. Diese sind wiederum auf die Methodik der Array-Technologie zurückzuführen (vgl. Pkt. 3.2.2).

6. und 7. Infektion DD-cDNA S3 1.Klon



6. und 7. Infektion DD-cDNA 46/4 4.Klon

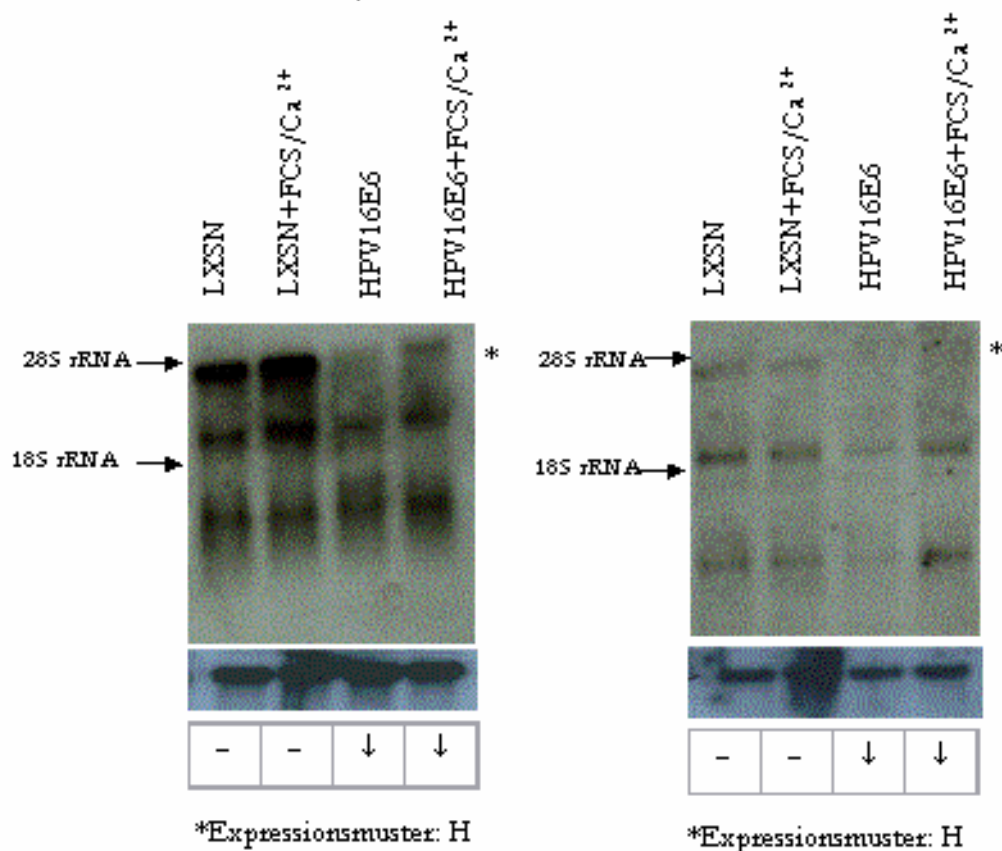


Abb 3/11 Northern-Blot-Hybridisierungen S3 1.Klon und 46/4 4.Klon

Vor allem die Ergebnisse für die vierte RNA-Probe (HPV16E6+FCS/Ca²⁺) der 4. und auch der 5. Infektion und wichen von den Northern-Blot-Ergebnissen ab (Abb. 3/12, Abb. 3/13, Abb. 3/14). Die Ergebnisse aller drei Methoden (ATLASTM-cDNA-Arrays, Reverser-Northern-Blot und konventioneller Northern-Blot) sind in Tab. 6/3 des Anhangs zusammengestellt. Eine sehr hohe Übereinstimmung für alle drei verwendeten molekularbiologischen Methoden für die Detektion von Expressionsunterschieden auf transkriptionellem Niveau zeigten die Ergebnisse für die Proben LXSN im Vergleich zu HPV16E6 (siehe Tab. 6/5 des Anhangs). Einzige Ausnahme stellte das Gen B08h in Bezug auf die Ergebnisse der Quantifizierung der ATLASTM-Arrays und der durchgeführten Northern-Blot-Hybridisierung dar.

Neben den Hybridisierungen mit RNA der 4. und der 5. Infektion wurden alle neun ATLASTM-Array Klone mit RNA der 6. und 7. Infektion hybridisiert (Abb. 3/15). Die Ergebnisse dieser Studien sind in Tab. 6/3 des Anhangs zusammengestellt. Sechs der neun cDNAs wurden in der 6. und der 7. Infektion differentiell exprimiert. Zwei davon waren konsistent exprimiert. Drei von neun cDNAs waren nur in der 6. Infektion differentiell exprimiert. Gene, die in ihrem Expressionsmuster konsistent im Vergleich zu den Ergebnissen der 4. und 5. Infektion waren, konnten in der 6. und 7. Infektion nicht detektiert werden. Wie schon bei der Hybridisierung mit den „Differential Display of mRNA-Klonen“ waren die 6. und die 7. Infektion in ihren Ergebnissen gut vergleichbar.

4. Infektion ATLASTM-cDNA A07d 1.Klon

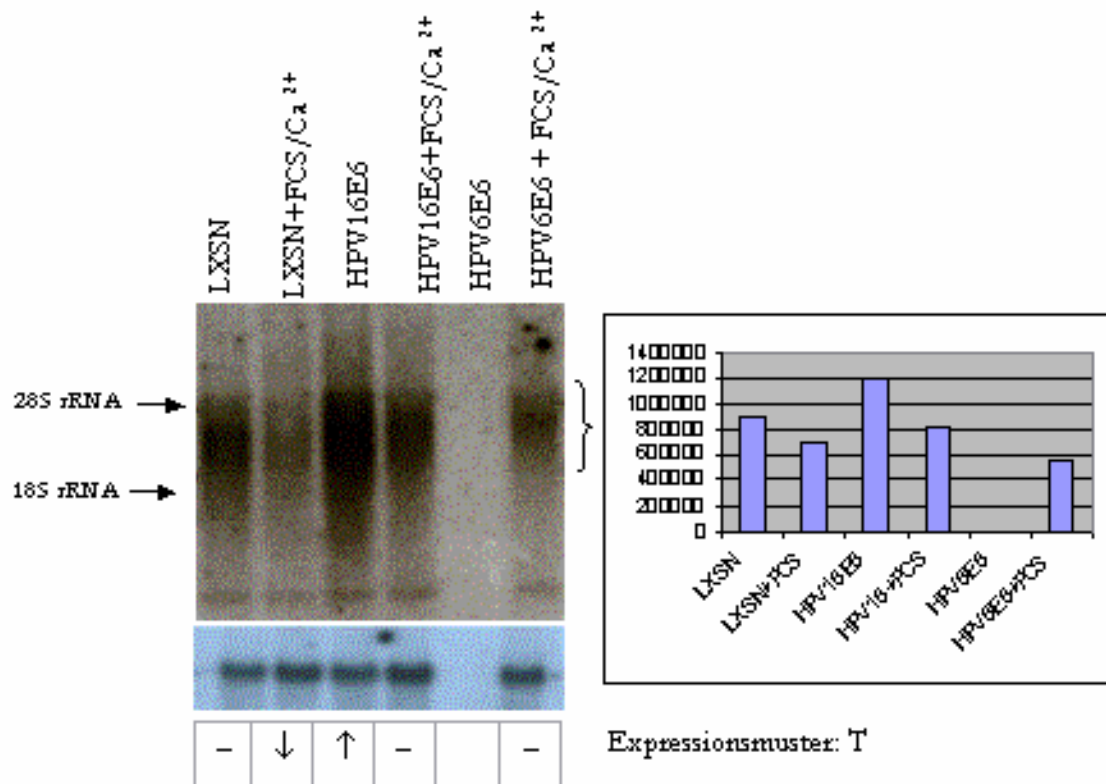
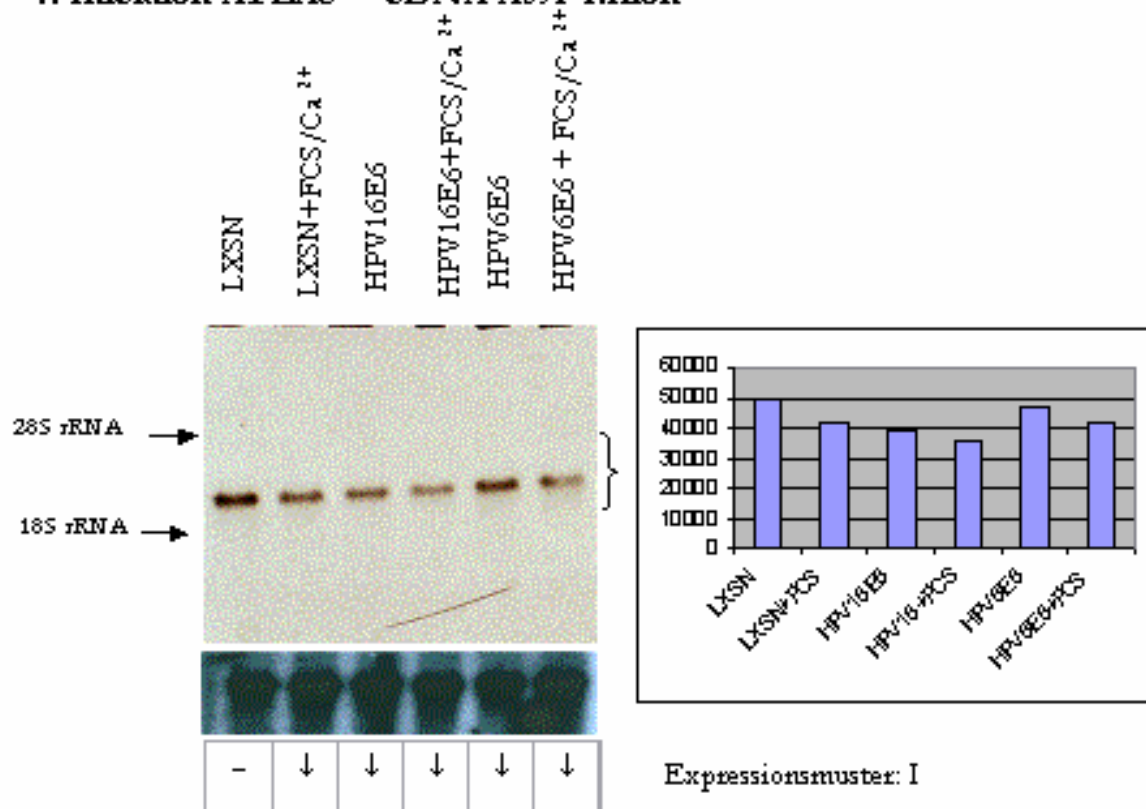


Abb. 3/12 Northern-Blot-Hybridisierungen A07d 1.Klon und A091 1.Klon. Die angegebenen Expressionsmuster beziehen sich auf die ersten 4 RNA-Proben

4. Infektion ATLASTM-cDNA A091 1.Klon



4. Infektion ATLASTM-cDNA B071 1.Klon

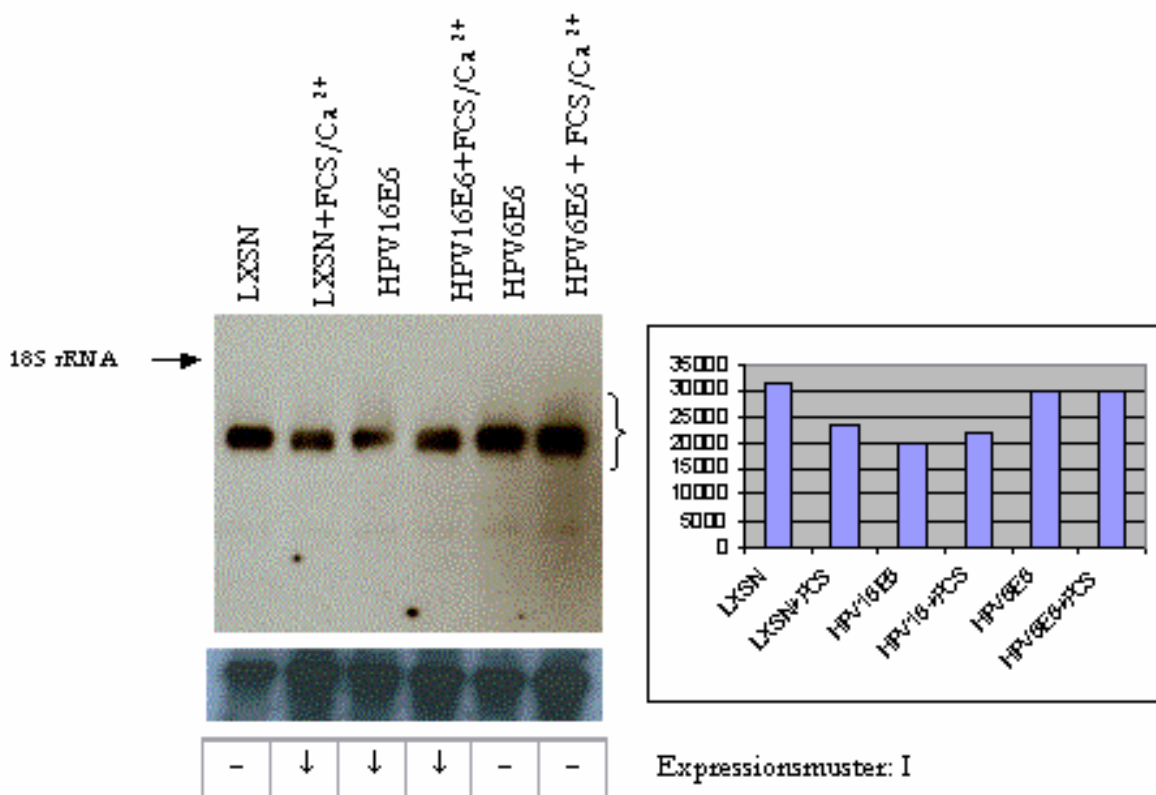
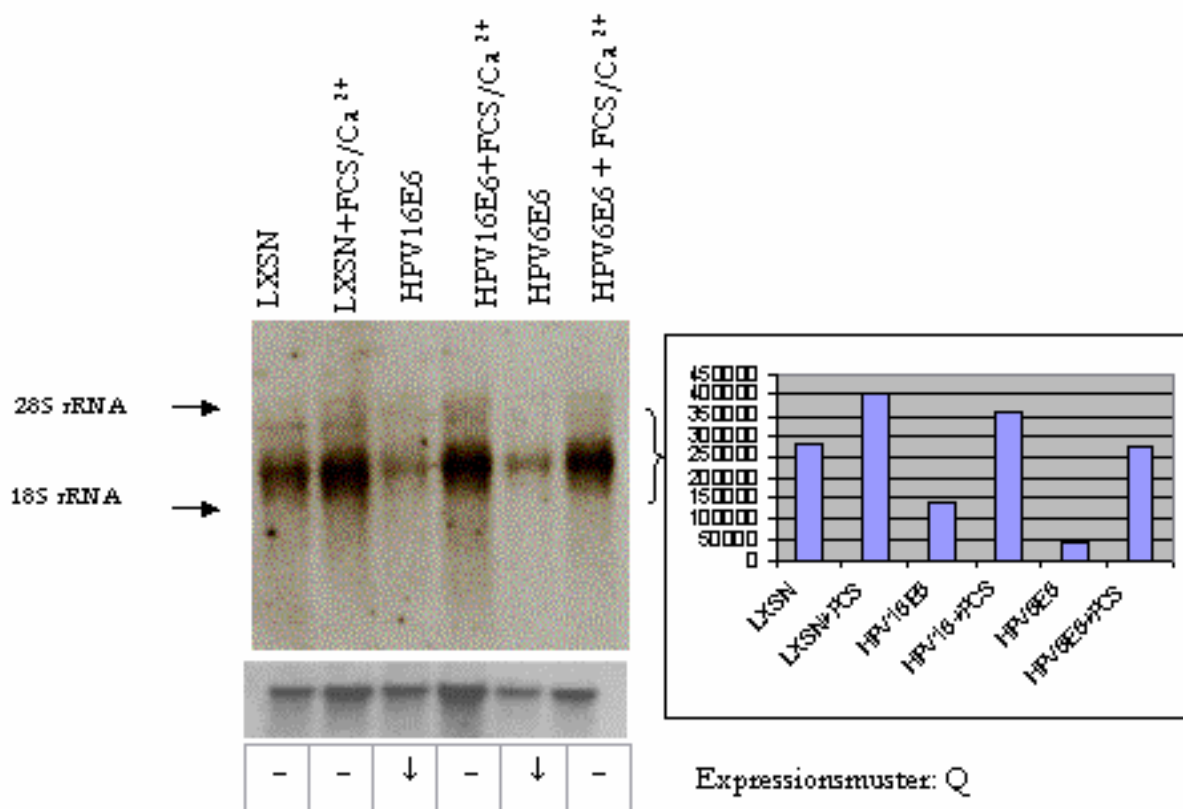


Abb. 3/13

Northern-Blot-Hybridisierungen A091 1.Klon und B071 1.Klon. Die angegebenen Expressionsmuster beziehen sich auf die ersten 4 RNA-Proben.

5. Infektion ATLASTM-cDNA Klon C13k 1.Klon



4. Infektion ATLASTM-cDNA Klon F12f 1. Klon

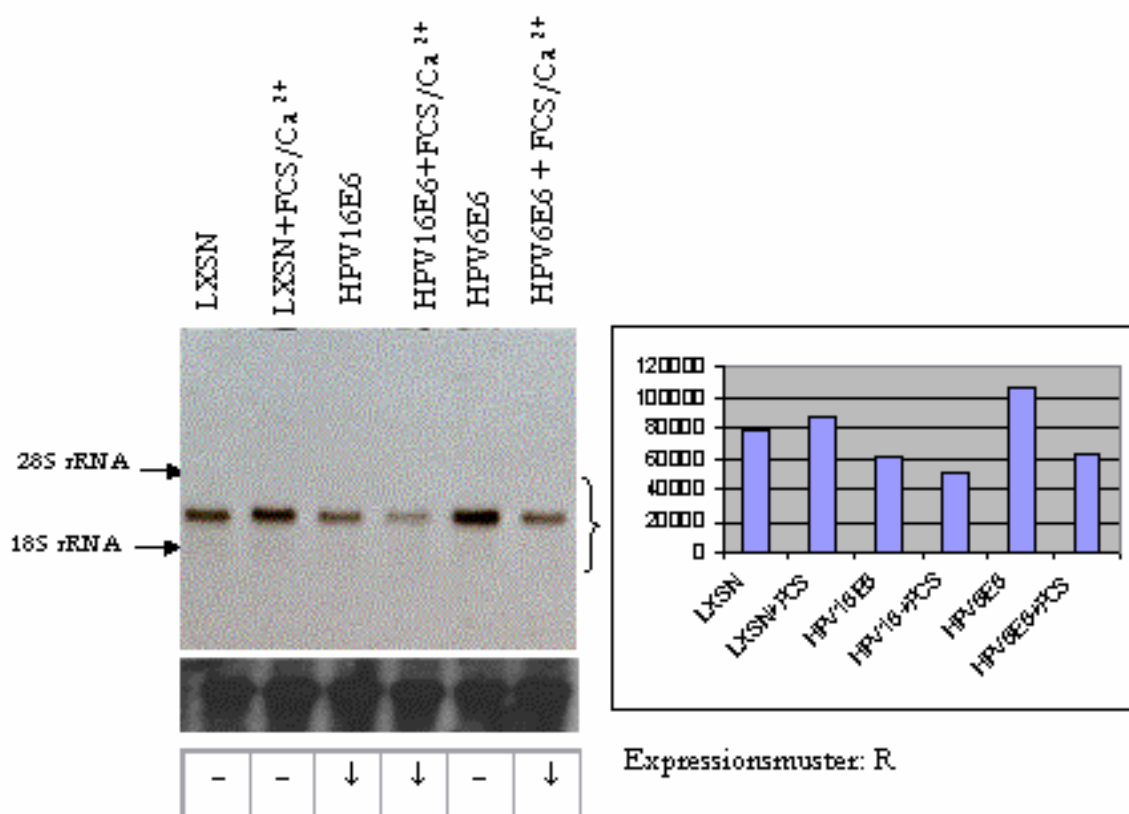
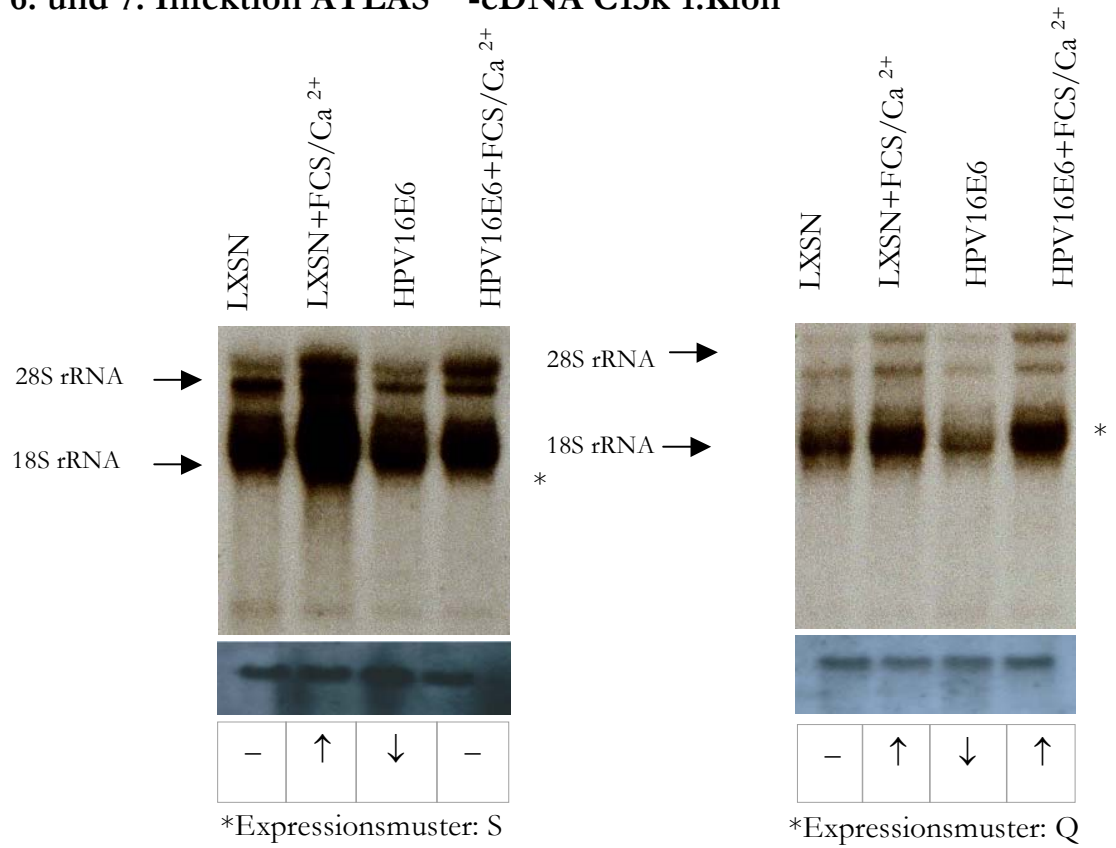


Abb. 3/14

Northern-Blot-Hybridisierungen C13k 1.Klon und F12f 1.Klon. Die angegebenen Expressionsmuster beziehen sich auf die ersten 4 RNA-Proben.

6. und 7. Infektion ATLAS™-cDNA C13k 1.Klon



6. und 7. Infektion ATLAS™-cDNA F12f 1.Klon

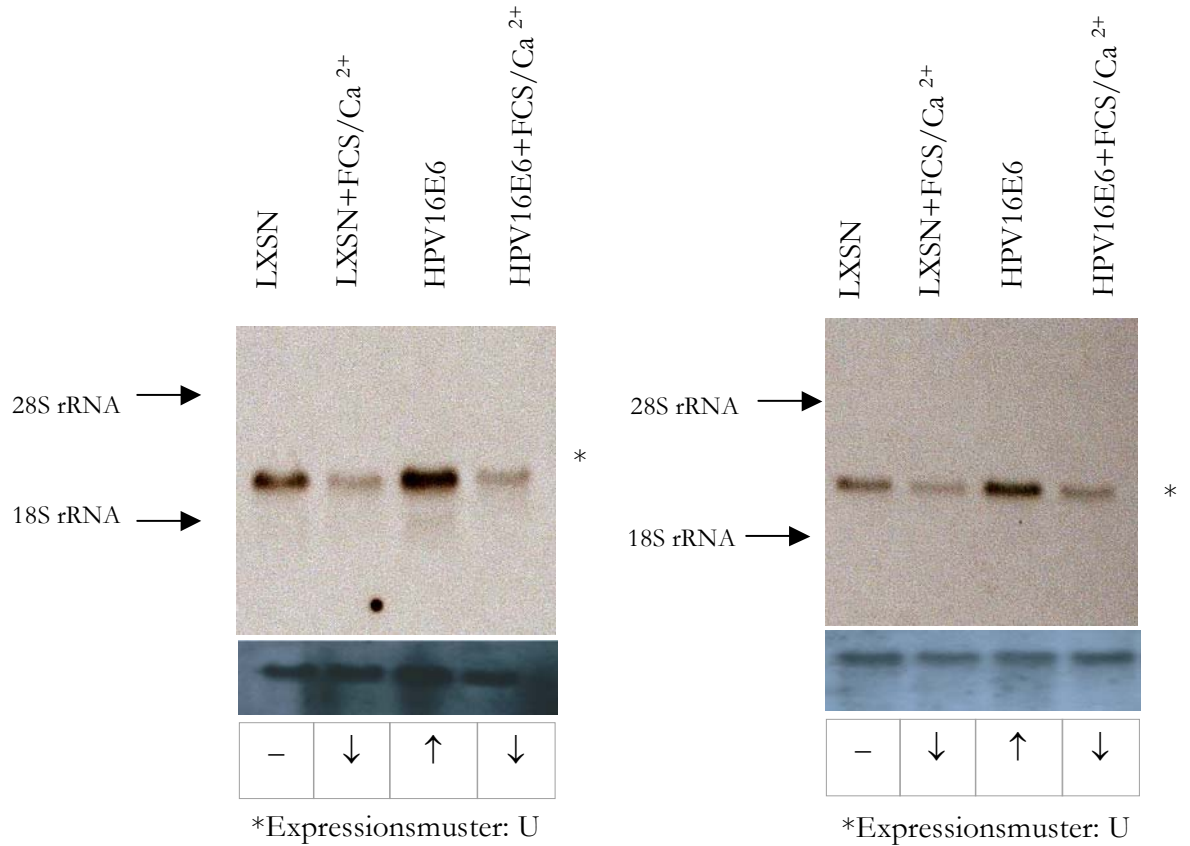


Abb. 3/15 Northern-Blot-Hybridisierungen C13k 1.Klon und F12f 1.Klon

3.5 Sekundäre densitometrische Auswertung der ATLASTM-Filter LXSN und HPV16E6 für die 4. und 5. Infektion

Die Auswertung der Ergebnisse zeigte eindeutig, dass durch das „Differential Display of mRNA“ und die ATLASTM-cDNA-Arrays Gene identifiziert wurden, die durch HPV16E6 differentiell reguliert wurden. Es zeigte sich durch die Auswertung aller Experimente, dass die primäre Arbeitshypothese der konsistenten Expressionsmuster in den untersuchten Infektionen nicht zutraf. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Ergebnisse für den Vergleich der ATLASTM-cDNA-Filter LXSN und HPV16E6 zum größten Teil reproduzierbar waren (Ausnahme B08h Tab. 6/5 des Anhangs). Resultierend aus diesen beiden Erkenntnissen wurden die ATLASTM-cDNA-Filter LXSN und HPV16E6 für die 4. und 5. Infektion ein weiteres Mal densitometrisch vermessen und alle signifikanten Unterschiede, die jedoch nur in der einen oder anderen Infektion vorkommen mussten, ermittelt. Für die 4. Infektion konnten insgesamt 12 durch HPV16E6 signifikant veränderte Gene und für die 5. Infektion 1 Gen ermittelt werden (Tab. 3/9 und 3/10). In Tab. 6/6 des Anhangs ist die vollständige densitometrische Auswertung dieser 13 Gene für die 4. und 5. Infektion zusammengefasst.

Gen-Nr.	Ratio LXSN/HPV16E6	Genbezeichnung
A01c	0,32	Proto-oncogene c-jun, transcriptionfactor AP-1
A03b	0,49	Ezrin, cytovillin 2, villin 2 (VIL2)
A10n	3,11	BTG-Protein-precursor, NGF-inducible anti-proliferative Protein PC3
A13c	0,48	Fos-related antigen (FRA1)
B02a	0,39	ADP/ATP carrier protein
B04a	0,37	ATP synthase coupling factor 6 mitochondrial precursor
B04k	0,26	Caveolin-1
B12m	0,45	Guanylate kinase (GMP kinase)
B13d	0,24	Ribosomal protein S6 kinase II alpha 1 (S6KII-alpha 1), ribosomal S6 kinase 1 (RSK1)
C04k	0,36	Nuclear factor kappa-B DNA binding subunit (NF-kappa B; NFkB)
E09b	0,48	Vascular endothelial growth factor precursor (VEGF), vascular permeability factor (VPF)
G29	0,48	Brain-specific tubulin alpha 1 subunit (TUBA 1)

Tab. 3/9

Zusätzliche mit ATLASTM-cDNA-Array identifizierte differentiell exprimierte Gene der 4. Infektion

Gen-Nr.	Ratio LXSN/HPV16E6	Genbezeichnung
D03n	2,03	(2'-5') oligoadenylate synthetase 2, ((2'-5') oligo(A) synthetase 2, 2-5A synthetase 2

Tab. 3/10

Zusätzliches mit ATLASTM-cDNA-Array identifiziertes differentiell exprimiertes Gen der 5. Infektion

3.6 Zusammenfassung der Ergebnisse

Mit Hilfe der Methode des „Differential Display of mRNA“ und der ATLASTM-cDNA-Array-Hybridisierungen konnten Gene identifiziert werden, die durch HPV16E6 differentiell auf transkriptionellem Niveau exprimiert wurden. Trotz der Untersuchung einer großen Anzahl von Genen konnte kein Gen identifiziert werden, dass in allen untersuchten Infektionen das gleiche Expressionsmuster aufwies.

Es konnte festgestellt werden, dass sich die Expressionsmuster der 4. und 5. Infektion sowie der 6. und 7. Infektion ähnlicher waren als die der 4. bzw. 5. Infektion mit den Expressionsmustern der 6. bzw. 7. Infektion. Dieses Phänomen ist mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die unterschiedliche Herkunft dieser RNAs zurückzuführen (Pkt. 2.2.3). Ein zweiter Grund für die Inkonsistenz der Genexpression könnte der individuelle Charakter der RNA-Proben sein. Diese stammten jeweils aus Keratinozyten eines Donors mit einem bestimmten Genotyp, der nicht weiter charakterisiert wurde.

Abb. 6/1 des Anhangs zeigt eine Übersicht über die Ergebnisse für die Untersuchungen des „Differential Display of mRNA“. Wie aus dieser Übersicht ersichtlich, konnten unabhängig von der Untersuchungsmethode immer etwas weniger als 50 % konsistent exprimierte cDNAs detektiert werden. So konnten mit Hilfe des „Differential Display of cDNA“ 218 cDNAs als HPV16E6-reguliert identifiziert werden. Nur 98 cDNAs (44 %) waren jedoch in der 1. und 3. Infektion bzw. 4. und 5. Infektion konsistent exprimiert. Ein ähnlicher Prozentsatz konsistent exprimierter Gene konnte auch bei der konventionellen Northern-Blot-Hybridisierung mit RNA der 6. und 7. Infektion ermittelt werden. Beim alleinigen Vergleich der ermittelten Expressionsmuster der 6. und 7. Infektion wurden 9 (41 %) von 22 Genen konsistent exprimiert.

Abb. 6/2 des Anhangs stellt die Ergebnisse für die ATLASTM-Arrays dar. Auch hier zeigte es sich, dass die 4. und 5. Infektion untereinander besser vergleichbar waren, als die 4. bzw. 5. Infektion mit der 6. bzw. 7. Infektion. Ein konsistent exprimiertes Gen für alle Infektionen konnte im Übereinstimmung mit den „Differential Display of mRNA“ Ergebnissen auch mit dieser Methode nicht ermittelt werden.

Aufgrund der Erkenntnis, dass es die konsistente Expression zumindest nicht unter den gegebenen Umständen gab, wurden die ATLASTM-Filter ein weiteres Mal densitometrisch ausgewertet. 13 zusätzliche Gene, die durch HPV16E6 transkriptionell verändert exprimiert wurden, konnten als HPV16E6-reguliert identifiziert werden. Ihre Expressionsunterschiede wurden für die 4. und 5. Infektion ermittelt (Tab. 6/6 des Anhangs). 9 Gene waren nicht konsistent exprimiert und spiegelten somit die Mehrheit der anderen bis dahin erhaltenen Ergebnisse wider.

4 Diskussion

4.1 Vergleich der Ergebnisse mit den Arbeiten anderer Arbeitsgruppen

Sherman und Schlegel (1996) schufen mit ihren Experimenten die Grundlage für die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit. Es wurde (wie in Pkt. 1.4.3.3 ausführlich beschrieben) durch diese Arbeitsgruppe experimentell belegt, dass eine retrovirale Transduktion von primären humanen Keratinozyten mit dem Gen für das HPV16E6-Volllängenprotein zur Ausbildung differenzierungsresistenter Keratinozytenkolonien führt. Durch diese Beobachtung konnte erstmalig gezeigt werden, dass das Onkoprotein E6 unabhängig von E7, dem zweiten wichtigen Onkoprotein der HR-HPV-Typen, eine entscheidende Rolle für die Entstehung des undifferenzierten Phänotyps von Tumorzellen spielt.

Durch die vorliegende Arbeit konnte mit Hilfe der molekularbiologischen Verfahren des „Differential Display of mRNA“ und der cDNA-Array-Hybridisierung bewiesen werden, dass die intrazelluläre Präsenz des Onkoproteins HPV16E6 zu einer differentiellen Genexpression auf transkriptioneller Ebene führt. 75 cDNAs konnten insgesamt identifiziert werden, die differentiell durch HPV16E6 exprimiert wurden. Es kann davon ausgegangen werden, dass einige der gefundenen Gene direkt oder indirekt mit der Differenzierungsresistenz in Verbindung stehen. Die meisten Gene wurden in allen untersuchten Infektionen ebenfalls in einer differenzierungsabhängigen Weise differentiell exprimiert. Nur für zwei cDNAs konnte dieses Verhalten nicht detektiert werden (S1 5.Klon, 23/1 3.Klon). Bei diesen kann aber mit den vorliegenden experimentellen Daten nicht ausgeschlossen werden, dass sie zu einem anderen Zeitpunkt in Abhängigkeit von den Differenzierungsfaktoren exprimiert worden wären (vgl. Pkt. 4.2).

Eine Herausforderung bei der Identifizierung der cDNAs waren die geringen Expressionsunterschiede zwischen den zu vergleichenden Zellpopulationen. Es konnte eine höchstens zwei- bis dreifach verstärkte bzw. verminderte Genexpression detektiert werden.

Die Literaturrecherche über die isolierten cDNAs zeigte, dass fast alle Gene mit apoptotischen bzw. antiapoptotischen Prozessen in Verbindung gebracht werden konnten (vgl. Pkt. 4.3.4). Publikationen, die während der Anfertigung dieser Arbeit erschienen, bestätigten die Quantität und auch die Qualität der detektierten Expressionsunterschiede und unterstützten so die Richtigkeit der vorliegenden Daten.

Die Arbeitsgruppe um Schlegel und Sherman zeigte in ihrer Folgepublikation (Alfandari et al. 1999), wie verschiedene Proteine (Differenzierungs- und Apoptosemarker) nach HPV16E6-Transduktion exprimiert wurden. Die Differenzierungsmarker Transglutaminase, Involucrin und Cytokeratin 19 wurden in mit Differenzierungsfaktoren (Serum und Kalzium) behandelten primären humanen Keratinozyten untersucht, welche vorher entweder mit dem Leervektor (LXSN) oder mit HPV16E6 transduziert worden waren. Die Ergebnisse der Western-Blot-Analysen von Alfandari et al. (1999) sind in Abb. 4/1 dargestellt.

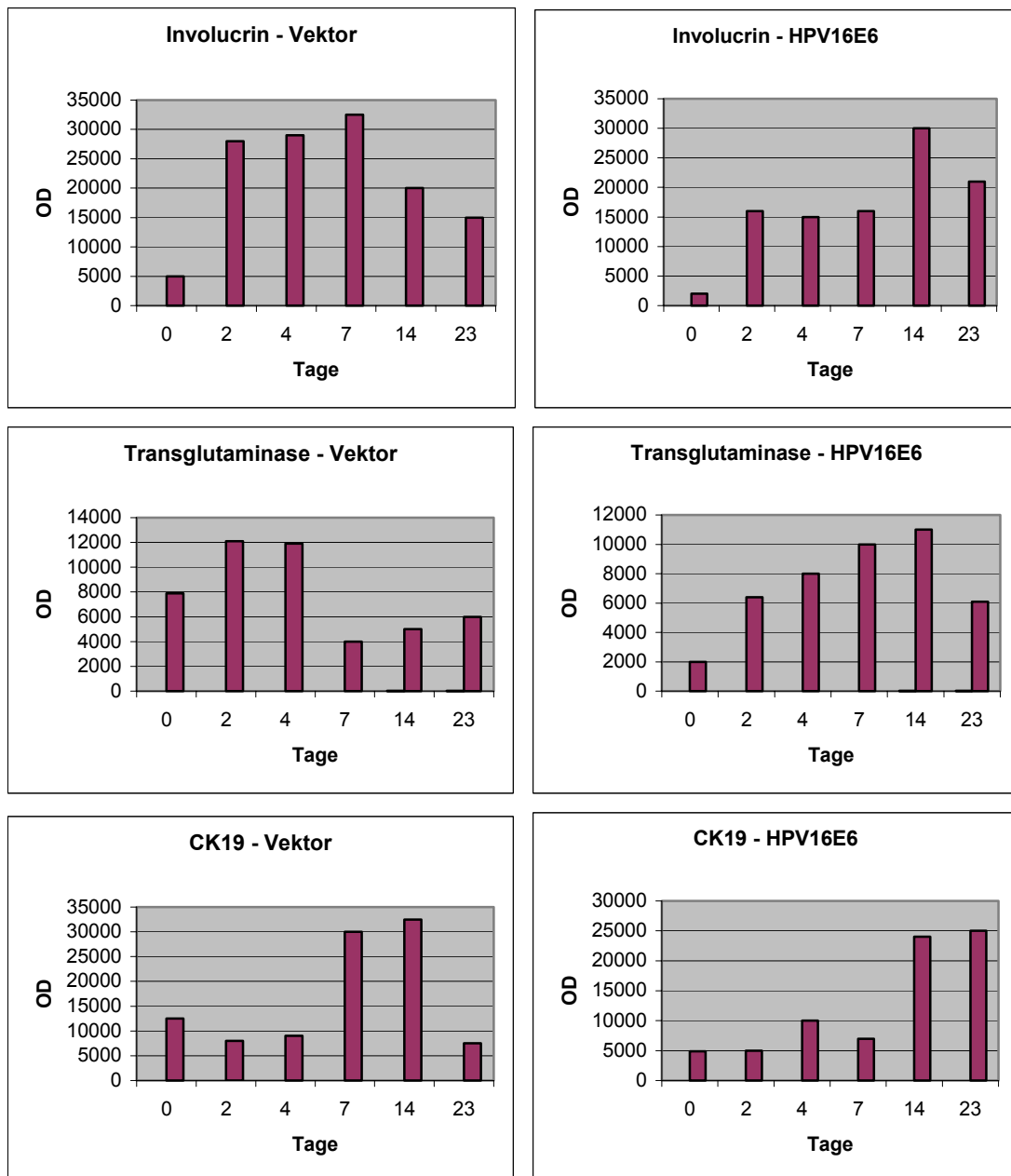


Abb. 4/1

Darstellung der Ergebnisse von Alfandari *et al.* (1999). Zeitabhängige Veränderungen in der Expression von differenzierungsspezifischen Proteinen in HPV16E6-transduzierten primären humanen Keratinozyten nach Zugabe der Differenzierungsfaktoren Serum und Kalzium. Die Quantifizierungsergebnisse der Western-Blot-Analysen sind in den Diagrammen zusammengestellt, die unterschiedlichen Expressionsstärken zum Zeitpunkt 0 Tage sind auf die HPV16E6-Expression zurückzuführen

Die Expression der oben aufgeführten Differenzierungsmarker wurde zwischen den beiden Zellpopulationen in einem Zeitraum von drei Wochen verglichen. In den ersten Tagen kam es in den Vektor-transduzierten Kontrollzellen zu einer verstärkten Expression der Differenzierungsmarker auf Proteinebene sowie nach der zweiten Woche zu einem Einbruch der Proteinexpression. Die Expressionsmuster in HPV16E6-transduzierten Keratinozyten waren ähnlich, aber temporal etwas verschoben. Die stärkste Expression der Differenzierungsmarker war in den HPV16E6-transduzierten Keratinozyten später als in den LXS^N-transduzierten Kontrollzellen zu beobachten. Deshalb wurde durch Alfandari *et al.* (1999) vermutet, dass die

HPV16E6-bedingte Differenzierungsresistenz durch die Unterdrückung bzw. zeitliche Verschiebung von apoptotischen Vorgängen zu Stande kommen könnte.

Für die Bestätigung dieser Vermutung wurden durch Alfandari et al. (1999) zusätzliche Experimente durchgeführt. Keratinozyten wurden ein weiteres Mal mit LXS_N bzw. HPV16E6 transduziert. 24 Stunden nach Transduktion wurde ein Medium zu den Keratinozyten gegeben, welches die Differenzierungsfaktoren Kalzium und Serum enthielt. Nach weiteren 24 Stunden wurden die transduzierten Keratinozyten mit der TUNEL-Färbung auf Apoptose überprüft. Zusätzlich wurden FACS-Analysen durchgeführt, um apoptotische Vorgänge durch Reduktion des intrazellulären DNA-Gehaltes zu detektieren. Durch beide Methoden konnten apoptotische Zellen sowohl in Vektor-transduzierten als auch in HPV16E6-transduzierten Keratinozyten gefunden werden. Bei den HPV16E6-transduzierten Zellen konnte im Vergleich zu den LXS_N-transduzierten Zellen jedoch ein reduziertes Auftreten von apoptotischen Merkmalen verzeichnet werden.

Mit zusätzlichen Western-Blot-Analysen wurde durch Alfandari et al. (1999) anschließend die Expression von Proteinen untersucht, die im Allgemeinen mit apoptotischen Vorgängen in Verbindung gebracht werden. Die Abundanz der proapoptotischen Proteine p53 und BAX sowie des antiapoptotischen Proteins BCL-2 wurde in LXS_N-transduzierten Zellen und HPV16E6-transduzierten Zellen miteinander verglichen. Aus den Ergebnissen ging eindeutig hervor, dass es zur erwarteten vollständigen Degradation des proapoptotischen Proteins p53 (vgl. Pkt. 1.4.1) sowie zur verminderten Expression des ebenfalls proapoptotischen Proteins BAX und zur verstärkten Expression des antiapoptotischen Proteins BCL-2 und damit zu einem veränderten apoptotischen Verhalten durch HPV16E6 kam (Alfandari et al. 1999).

Obwohl in der vorliegenden Arbeit die durch HPV16E6 verursachten Veränderungen der Genexpression auf transkriptioneller und nicht auf translationaler Ebene untersucht wurden, stimmen die ermittelten Expressionsunterschiede quantitativ gut mit den von Alfandari et al. (1999) ermittelten Daten überein. Bei semiquantitativer Betrachtungsweise der Ergebnisse von Alfandari et al. (1999) ist zu erkennen, dass sich nach zwei Tagen bei den Differenzierungsmarkern Transglutaminase, Involucrin und Cytokeratin 19 die Expressionsunterschiede zwischen HPV16E6-transduzierten Zellen und den Kontrollzellen um den Faktor zwei herum bewegen.

Eine weitere Arbeitsgruppe (Nees et al. 2000 und 2001) beschäftigte sich ebenfalls mit den Prozessen, die der HPV16-bedingten Differenzierungsresistenz zu Grunde liegen. Sie führte Untersuchungen auf transkriptioneller Ebene mit Hilfe von cDNA-Mikroarrays durch. Da die in beiden Arbeiten gewonnenen Ergebnisse miteinander vergleichbar sind, soll hier vor allem auf die Publikation aus dem Jahr 2001 näher eingegangen werden. Die verwendeten cDNA-Mikroarrays wurden computergestützt ausgewertet. Durch Nees et al. (2001) wurden die Genexpressionsmuster von LXS_N-transduzierten und HPV16E6E7-exprimierenden zervikalen Keratinozyten miteinander verglichen. Es wurden ebenfalls Hybridisierungen mit nur HPV16E6-transduzierten zervikalen Keratinozyten durchgeführt. Nees et al. (2001) konnten zeigen, dass E6 und E7 die Expression einer Anzahl von zellulären Genen verändert. HPV16E6

und E7 führten in Abhängigkeit vom individuellen Charakter des Keratinozytendonors zu der Veränderung von 80 – 90 (4%) von insgesamt 2208 (100%) aufgespotteten Array-cDNAs.

In Tab. 4/1 sind einige der als HPV16E6E7 auf transkriptionellem Niveau regulierten und durch Nees *et al.* (2001) detektierten Gene zusammengestellt. Die Werte für die nur mit HPV16E6 transduzierten Keratinozyten wurden durch Nees *et al.* (2001) nicht tabellarisch aufgeführt. Es wurde aber erwähnt, dass die Expressionsunterschiede, die durch HPV16E6E7 zu beobachten waren, auch bei alleiniger Transduktion von E6 auftraten. Dabei waren jedoch die beobachteten Expressionsunterschiede im Vergleich zu den LXS_N-transduzierten Zellen geringer. Wie aus Tab. 4/1 ersichtlich, kam es durch HPV16E6E7-Kotransduktion zu einer zwei- bis dreifach verstärkten bzw. verminderten Genexpression im Vergleich zu den Leervektor-transduzierten Kontrollzellen. Damit stimmten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit auch quantitativ sehr gut mit der Arbeit von Nees *et al.* (2001) überein.

Gene	Quotient: Retrovirus-E6E7-transduziert /Vektor
Cluster I	
TGF- β	0,56
p21	0,47
Keratin 6	0,26
Cluster II	
TRAIL/Apo-2 ligand	0,33
Stat50	0,45
RDC1	0,66
Fibroblast growth factor receptor 2	0,35
IFN-induced 17-kDa protein	0,18
Inositol phosphatase IPP110	0,45
MyD88	0,45
IFN-induced 56-kDa protein	0,37
IFN-induced 54-kDa protein	0,43
IFN-induced protein 9-27	0,43
STAT-induced STAT inhibitor	0,45
IFN-induced protein IFI-6-16	0,24
2'-5'-Oligoadenylate synthetase E (OAS1)	0,45
Cluster III	
Survivin/apoptosis inhibitor 4	3,22
Cyclin A	2,67
JkR1	2,04

Tab. 4/1

Auszug der Ergebnisse der Expressionsanalysen von Nees *et al.* (2001). Dargestellt sind Beispiele für HPV16E6E7-regulierte Gene der cDNA-Array-Cluster I, II und III.

Auch qualitativ korrelierten die gesammelten Daten dieser Arbeit mit den Arbeiten von Nees *et al.* (2000 und 2001) (siehe Tab. 4/1). Die Gene, die sich auf dem cDNA-Array befanden, waren in funktionelle Gruppen (Cluster) eingeteilt. Auffällig viele veränderte Gene kamen in den Clustern II und III des verwendeten cDNA-Arrays vor. Diese Cluster beinhalteten Interferon(IFN)-induzierbare Gene. Nees *et al.* (2001) konnten z.B. zeigen, dass zwei Isoformen der 2'-5'-Oligonukleotid-Synthase in ihrer Expression runterreguliert wurden. Dieses Enzym ist eins der am besten als IFN-induzierbar charakterisierten Genprodukte. Die Isoform 2 konnte auch in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe der ATLASTM-Arrays als HPV16E6-reguliert identifiziert werden. Eine dritte nicht durch Nees *et al.* (2001) identifizierte Isoform (Isoform 3) wurde in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe des „Differential Display of mRNA“ als HPV16E6-reguliert detektiert.

Ein weiterer Kandidat, das „Interferon inducible Protein 27-9“, wurde durch Nees *et al.* (2001) als HPV16-reguliert identifiziert. Dieses Protein konnte innerhalb dieser Arbeit ebenfalls kloniert werden.

Der Nachweis durch Nees et al. (2000 und 2001) und durch die hier vorliegenden Arbeit, dass die HPV16-Onkoproteine auf die Expression von IFN-aktivierten Genen Einfluss haben, konnte auch durch die Arbeiten an einem anderen HR-HPV-Typ manifestiert werden. Chang und Laimins (2000) zeigten für HPV31, dass dessen Onkoproteine die Expression IFN-induzierbarer Gene beeinflussen.

4.2 Die beobachteten Expressionsmuster der differentiell regulierten Klone - Konsistenz und Inkonsistenz

Innerhalb dieser Arbeit wurde versucht, Gene zu identifizieren, die nach HPV16E6-Trasduktion in primären humanen Keratinozyten in gleicher Art und Weise, unabhängig vom Keratinozytendonator und anderen experimentellen Variablen, differentiell exprimiert worden waren. Für solche Gene sollten die Expressionsmuster in den vier RNA-Vergleichsproben (LXSN, LXSN+FCS/Ca²⁺, HPV16E6 und HPV16E6+FCS/Ca²⁺) immer gleich, d.h. konsistent sein. Für keinen der 53 klonierten und als differentiell durch HPV16E6 exprimiert verifizierten „Differential Display of mRNA“-Klone und auch für keines der mit Hilfe der ATLASTM-cDNA-Arrays detektierten Gene konnte diese Konsistenz für alle Infektionen gezeigt werden. Sowohl beim „Differential Display of mRNA“ als auch bei den Untersuchungen mit Hilfe der cDNA-Arrays wurde von Anfang an versucht, in den jeweils beiden Ausgangsinfektionen (1. und 3. Infektion sowie 4. und 5. Infektion beim „Differential Display of mRNA“ sowie 4. und 5. Infektion bei den ATLASTM-cDNA-Arrays) die konsistent exprimierten Gene zu detektieren, zu klonieren und zu verifizieren. Es stellte sich jedoch heraus, dass es neben diesen konsistent exprimierten cDNAs immer eine große Anzahl von differentiell exprimierten Genen gab, die zwar signifikant differentiell, nicht jedoch konsistent in den verglichenen Infektionen verändert waren. Durch die anschließenden Verifikationsrunden mit Hilfe des Reversen-Northern-Blots sowie des konventionellen Northern-Blots zeichnete es sich immer deutlicher ab, dass es noch relativ wahrscheinlich war, konsistent differentiell exprimierte Gene beim Vergleich von zwei Infektionen zu finden, nicht jedoch beim Vergleich von drei oder mehr unabhängigen Infektionen.

Gleichzeitig war erkennbar, dass die Infektionen 4 und 5 in Bezug auf die detektierten Expressionsmuster zueinander ähnlicher waren als die 4. (bzw. 5.) Infektion zur 6. (bzw. 7.) Infektion. Auch die 6. und 7. Infektion verhielten sich zueinander sehr ähnlich. Wie bereits schon erwähnt (Pkt. 3.6), gab es dafür zwei wichtige Gründe. Zum einem wurden die Transduktionsexperimente zur Gewinnung der RNAs der 4. und 5. Infektion durch N. Whitaker (Heidelberg, Deutschland) durchgeführt und die der 6. und 7. Infektion durch L. Sherman (Tel Aviv, Israel). Obwohl das experimentelle Vorgehen beider Labors auf dem gleichen Protokoll

basierte, ist es möglich, dass es aufgrund von unterschiedlichem Handling zu Expressionsunterschieden kommen konnte, die sich in den Infektionen widerspiegeln. Zum anderen wurden zur Durchführung der Transduktionsexperimente Keratinozyten individueller Spender genommen. Sechs verschiedene Genotypen (1., 3., 4., 5., 6. und 7. Infektion) wurden ebenfalls durch die zu beobachtenden, oft nicht konsistenten Genexpressionsmuster reflektiert. Stark vereinfacht kann man davon ausgehen, dass sich das genotypisch determinierte Verhalten in der Detektion von differentiell regulierten, aber inkonsistenten Genen in der 4. und 5. Infektion bzw. 6. und 7. Infektion ausdrückte, die zeitliche Komponente, bedingt durch Unterschiede im experimentellen Vorgehen der beiden Experimentatoren, die die RNA präparierten, vor allem durch die größere Ähnlichkeit der 4. mit der 5. Infektion und der 6. mit der 7. Infektion.

Trotz der Tatsache, dass für keine detektierte cDNA eine konsistente Expression beobachtet werden konnte, waren die meisten in allen durchgeführten Untersuchungen eindeutig durch HPV16E6 differentiell im Vergleich zu den Kontrollzellen exprimiert. In seltenen Fällen konnte für die eine oder andere Infektion auch keine Expressionsveränderung beobachtet werden, obwohl bereits für andere Infektionen gezeigt werden konnte, dass es eine HPV16E6-bedingte Veränderung der Transkription gab. Letztere Beobachtung schließt jedoch nicht aus, dass das Gen nicht auch in dieser Infektion, in der eine konstitutive, d.h. unveränderte Expression beobachtet werden konnte, nicht differentiell reguliert wurde oder, wenn das Experiment weitergeführt worden wäre, nicht differentiell reguliert worden wäre.

Um dieses besser zu verdeutlichen, soll an dieser Stelle ein vereinfachtes Modell mit nur zwei Vergleichsproben zur Erklärung des Phänomens der inkonsistenten differentiellen Genexpression und zum Teil nicht beobachtbaren differentiellen Genexpression herangezogen werden. In Abb. 4/2 ist die fiktive zeitliche Veränderung eines hypothetischen Gens X in „LXSN- und HPV16E6-transduzierten“ Zellen schematisch dargestellt. Wie bereits besprochen (Pkt. 4.3.1), konnte durch Alfandari *et al.* (1999) nach Transduktion des HPV16E6-Gens in die Keratinozyten eine zeitlich veränderte Expression der Gene beobachtet werden. Es kam zu einem verspäteten Erreichen der Expressionsstärke, die in den „LXSN-transduzierten“ Kontrollzellen beobachtet werden konnte. Dargestellt ist die hypothetische Expressionsstärke des Gens X für die Zeitpunkte 1 - 7. Wie zu erkennen ist, kommt es in diesem Modell bei den „HPV16E6-transduzierten“ Zellen zum Erreichen der gleichen Expressionsstärke zum Zeitpunkt $t+1$.

In Abb. 4/3 (oben) ist die Genexpression schematisch aufgetragen, die in einem Northern-Blot für das Gen X zu detektieren wäre, wenn man die RNAs zum Zeitpunkt 3 des fiktiven Experiments geerntet hätte. In Abb. 4/3 (Mitte) sind die Expressionsstärken abgetragen, die gemessen würden, wenn die Expression zum Zeitpunkt 5 untersucht worden wäre. Hier würde es zur Detektion einer unveränderten Genexpression kommen, obwohl es sich um ein reguliertes Gen handelte. In Abb. 4/3 (unten) ist das Gleiche für den Zeitpunkt 6 abgetragen. Es ist zu erkennen, dass durch kleine zeitliche Differenzen, verursacht durch experimentelle Ungenauigkeiten, aber auch durch das genotypisch determinierte zeitliche Verhalten der Zellen

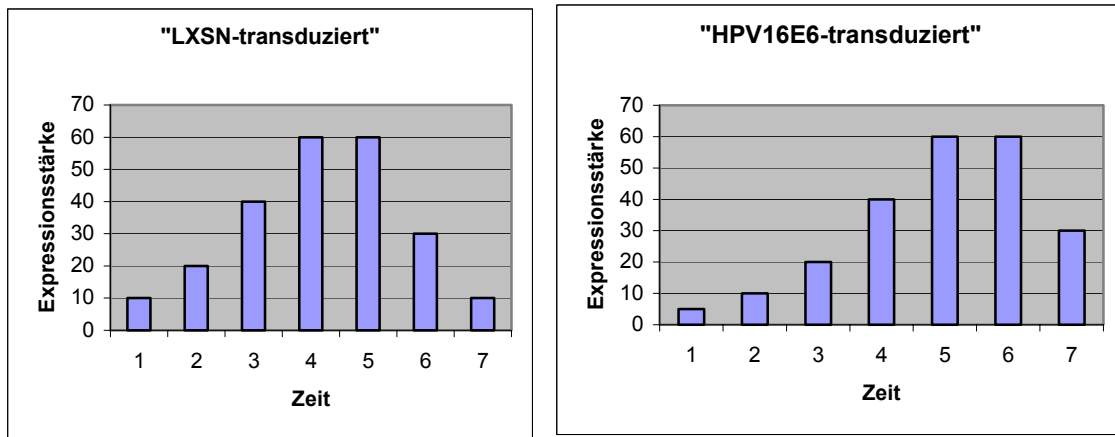


Abb. 4/2

Modell: Zeitlicher Verlauf der Expressionsstärken eines hypothetischen Gens X in „LXS- und HPV16E6-transduzierten“ Keratinozyten

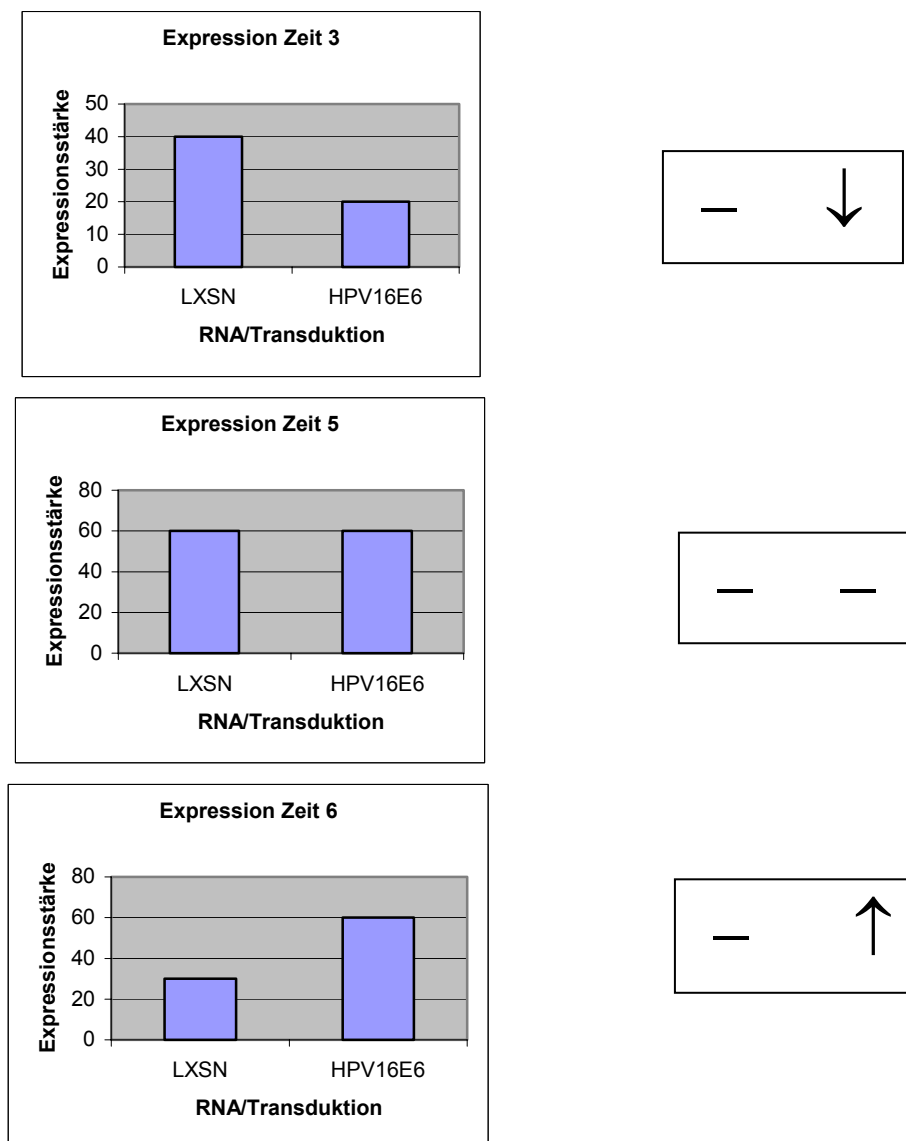


Abb. 4/3

Modell detektierbarer Expressionsstärken (z.B. durch Northern-Blot-Hybridisierung) des Gens X zu den Zeitpunkten 3, 5 und 6.

(—) = gleiche Expression, (↑) = stärkere Expression, (↓) = schwächere Expression im Vergleich zur LXS-Expression

(langsames oder schnelleres Reagieren auf HPV16E6), verschiedene Expressionsmuster detektiert werden können, die sich wie für die Zeitpunkte 4 und 6 sogar invers verhalten würden. Solche sich invers verhaltenden Expressionsunterschiede sind des Öfteren in dieser Arbeit detektiert worden (z.B. F12f Abb. 3/14 unten und Abb. 3/15 unten). Bei der Betrachtung des Zeitpunktes 5 des fiktiven Experiments kann, obwohl Gen X durch HPV16E6 in dieser „Infektion“ verändert exprimiert wurde, keine differentielle Genexpression beobachtet werden (z.B. Gen 23/1 3.Klon Expressionsmuster „P“ in der 6. und 7. Infektion, siehe Tab. 6/1).

In der vorliegenden Arbeit wurden die Untersuchungen mit vier Proben (LXSN, LXSN+FCS/Ca²⁺, HPV16E6 und HPV16E6+FCS/Ca²⁺) durchgeführt. Dadurch erhöht sich jedoch nur die Komplexität der beobachteten Expressionsmuster. Das hier entwickelte Modell ist jedoch unverändert gültig.

4.3 Charakterisierung der als HPV16E6-reguliert identifizierten Klone

4.3.1 Apoptose

Unter Apoptose wird der programmierte Tod von Zellen verstanden. Der programmierte Zelltod ist ein normaler physiologischer Prozess. Er kann unter anderem bei der Embryogenese, aber auch bei der Gewebshomeostase beobachtet werden. Das Phänomen des apoptotischen Zelltods wurde als erstes durch Kerr *et al.* (1972) definiert. Der Begriff wird heute benutzt, um den Prozess zu beschreiben, bei dem eine Zelle an ihrem eigenen Destrukturierungsprozess aktiv teilnimmt.

Die Apoptose ist durch einige morphologische Merkmale charakterisiert. Diese beinhalten u.a. Veränderungen der Plasmamembran, den Verlust der Membranasymmetrie, die Kondensation des Zytoplasmas und des Zellkerns sowie die DNA-Fragmentation. Im Endstadium werden die sterbenden Zellen in die so genannten apoptotischen Körperchen fragmentiert. Diese werden durch phagozytierende Zellen beseitigt. Apoptotische Vorgänge laufen ohne inflammatorische Prozesse in der Zellumgebung ab.

Neben dem apoptotischen gibt es noch einen zweiten Prozess des Zelltodes, der als Nekrose bezeichnet wird. Die Nekrose ist bei mechanischer Zellverletzung und bei Anwendung von Chemikalien zu beobachten. Sie kann sowohl morphologisch als auch biochemisch von der Apoptose unterschieden werden. Im Gegensatz zur Apoptose kann die Nekrose inflammatorische Reaktionen auslösen. Diese kommen durch das Entlassen des Zellinhaltes und somit auch vieler proteolytischer Enzyme in die Zellumgebung zu Stande. Bei der Nekrose handelt es sich im Gegensatz zur Apoptose nicht um einen genetisch gesteuerten Prozess (Melcher *et al.* 1999).

Neben der Bedeutung der Apoptose bei „normalen“ Entwicklungsprozessen des Organismus hat der programmierte Zelltod auch bei vielen klinischen Prozessen eine große Bedeutung. Ihm wird eine wichtige Rolle bei der Alzheimer- (Roth 2001, Broe *et al.* 2001) und der Hodgkins-

Krankheit (Ohshima *et al.* 2001) zugeschrieben. Durch Deregulation apoptotischer Ereignisse kann es zur Initiation der Karzinogenese kommen. Bei vielen Karzinomen ist eine p53-Inaktivierung und/oder eine BCL2-Überexpression beobachtbar (z.B. Bold *et al.* 2001a und 2001b). Während p53 ein proapoptotisches Protein ist, verhindert BCL2 antiapoptotisch den programmierten Zelltod.

Die Apoptose kann durch Zellverletzung aufgrund verschiedener exogen wirkender Agenzien (z.B. UV-Strahlung, Chemikalien und Viren) oder durch Veränderungen einer Reihe von endogenen Signalen (z.B. Hormonen, Wachstums- und Überlebensfaktoren) ausgelöst werden.

Mindestens drei allgemeine apoptotische Reaktionswege sind in der Literatur beschrieben worden (Susin *et al.* 1998, Leo *et al.* 2001, Barber 2001). Diese existieren nicht unabhängig nebeneinander, sondern sind miteinander verbunden. Der erste apoptotische Reaktionsweg wird durch so genannte Todesrezeptoren wie Fas und TNF-R1 (Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor) vermittelt. Todesrezeptoren sind Mitglieder der TNF-/NGF-Familie. Die Todesrezeptoren beinhalten eine zytoplasmatische Region, welche als Todesdomäne bezeichnet wird. Sie ist für die Signalübertragung verantwortlich. Ihre Aktivierung führt zum Zelltod. Das extrazelluläre Signal der Ligandbindung wird intrazellulär weitergeleitet. Als Folgereaktion werden die Caspasen 3, 6 und 7 (zytosolische Caspasen) aktiviert.

An dem zweiten apoptotischen Reaktionsweg sind die Mitochondrien beteiligt. Die auslösenden Faktoren führen zu einer Erhöhung der Permeabilität der äußeren mitochondrialen Membran. Cytochrom C, welches im intermembranalen Raum der Mitochondrien lokalisiert ist, wird durch die Erhöhung der Membranpermeabilität in das Zytosol entlassen. Im Zytosol bindet Cytochrom C den Apoptose-Protease-Aktivierenden-Faktor 1 (APAF-1), welcher mit der Procaspase 9 komplexiert ist. Diese Komplexbildung resultiert in der Prozessierung der Procaspase 9. Die aktive Caspase 9 wird als Ergebnis freigesetzt. Die Caspase 9 wiederum aktiviert andere Caspasen durch Prozessierung der Procaspasen. Dadurch kommt es zu einer Amplifizierung der Signalübertragung. Die aktivierten Caspasen sind proteolytisch aktiv und spalten die 45 kDa inhibitorische Untereinheit des DNA-Fragmentations-Faktor-Komplexes (DFF-Komplexes) ab. Dabei kommt es zur Freisetzung der aktiven 40 kDa DNase-Untereinheit des DFF. Diese DNase fragmentiert die chromosomale DNA in Apoptose-typischer Weise.

Der dritte apoptotische Weg wird über Interferone vermittelt. Interferone (IFN) sind Teil des primären Verteidigungsmechanismus gegen virale Infektionen. Die Interferone sind nicht nur an der antiviralen Abwehr, sondern auch an der Zellwachstumsregulation und der Immunaktivierung beteiligt. Durch das intrazelluläre Auftreten von doppelsträngiger RNA (ds RNA) werden Zellen stimuliert, Interferone zu produzieren und zu sezernieren. Das Vorkommen von ds RNA ist ein typisches Ereignis während viraler Infektionen. Neben vielen anderen Mechanismen, die durch IFN ausgelöst werden, wurde durch Lee und Esteban (1994) gezeigt, dass Interferone Apoptose initiieren können. Durch Aktivierung dieses Reaktionsweges wird die Transkription von Zielgenen gestartet. Diese zellulären Gene stehen mit der antiviralen Antwort der Zelle in Zusammenhang.

4.3.2 Antiapoptotische virale Strategien

Die Induktion der Apoptose in virusinfizierten Zellen ist ein bedeutender Verteidigungsmechanismus eukaryotischer Zellen gegen virale Infektionen. Viren haben verschiedene Strategien entwickelt, um die Apoptose der Wirtszelle zu umgehen. Einige virale Genome kodieren für Proteine, die eine hohe Homologie zu zellulären antiapoptotischen Proteinen der eukaryotischen Zelle (z.B. BCL-2 oder Serpin) zeigen (Tschopp *et al.* 1998). Diese Proteine verhindern das Auslösen der Apoptose durch Todes-Rezeptoren bzw. durch mitochondriale Prozesse effizient (Tab. 4/2). Andere Viren kodieren Proteine, die selbst keine homologen Bereiche zu diesen antiapoptotischen Proteinen zeigen, die jedoch proapoptotische Proteine binden können und diese damit inaktivieren. Diese Strategie wird auch durch HPV verfolgt (z.B. E6-p53-Interaktion).

Die virale Interferenz mit der Wirtszellapoptose fördert die virale Replikation und kann dadurch zur Entstehung von Krebs führen. Die Interaktion der viralen Genprodukte erfolgt über Wechselwirkung mit Wirtszellgenprodukten, die an den verschiedenen Reaktionswegen der Apoptose beteiligt sind. Die Charakterisierung von viralen Proteinen hilft, die molekularen Mechanismen der Apoptoseinhibition und somit die Prozesse der Karzinogenese zu verstehen.

Virale antiapoptotische Gene						
	Virale Effektoren für bekannte zelluläre Homologe					Keine zellulären Homologe
Virus	FLIP	BCL-2	IAP	Serpin	GADD34	
<u>Lymphotrope γ-Herpesviren</u>						
HVS	ORF71	ORF16	—	—	—	—
EHV-2	E8	E4	—	—	—	—
BHV-4	E1.1	BORFB2	—	—	—	—
EBV	—	BHRF-1	—	—	—	—
AHV-1	—	A9	—	—	—	—
H. atelesa (+)	ORF71	ORF16	—	—	—	—
MHV68	—	M1	—	M1	—	—
<u>α-und β-Herpesviren</u>						
Herpes Simplex Virus	—	—	—	—	$\gamma 1$ (34.5)	ICP, Us3
HCMV	—	—	—	—	—	IE1, IE2
<u>Poxviren</u>						
Cowpox	—	—	—	CrmA	—	—
Vaccina	—	—	—	SPI-2	—	—
MCV	159L, 160L	—	—	—	—	—
<u>Papovaviren</u>						
SV40	—	—	—	—	—	Large T
Papillomaviren	—	—	—	—	—	E6
<u>Adenoviren</u>	—	E1B-19K	—	—	—	E1B-55K
African Swine fever Virus	—	5-HL38	PA224L	—	—	—
Baculoviren	—	—	Op-IAP	—	—	P35

Tab. 4/2 Übersicht der antiapoptotischen viralen Proteine nach Tschopp *et al.* (1998)

4.3.3 Terminale Keratinozytendifferenzierung *in vivo* und Apoptose

Innerhalb dieser Arbeit wurden Gene als HPV16E6-reguliert identifiziert, die mit dem apoptotischen bzw. antiapoptotischen Geschehen in Verbindung gebracht werden können. Sie konnten den drei unterschiedlichen apoptotischen Reaktionswegen, die unter Pkt. 4.3.1 genannt wurden, zugeordnet werden.

Alfandari *et al.* (1999) zeigten, dass eine HPV16E6-Transduktion in primäre humane Keratinozyten zu einem veränderten apoptotischen Verhalten *in vitro* führte. Die terminale Differenzierung *in vitro* war mit Apoptose verbunden (Alfandari *et al.* 1999). Es konnten die typischen Merkmale der Apoptose detektiert werden. *In vitro* konnten die Keratinozytendifferenzierung und die damit verbundene Apoptose durch Zugabe von Serum und Kalzium in hohen Konzentrationen ins Medium ausgelöst werden (Eckert *et al.* 1997). Dabei konnte ein 50 %iger Anstieg der Bax-Expression beobachtet werden.

In vivo ist die terminale Differenzierung von epidermalen Keratinozyten ebenfalls mit drastischen morphologischen und biochemischen Veränderungen der Zellen verbunden. Es ist noch nicht vollständig geklärt, ob das *in-vitro*-Geschehen der Zellkultur mit dem *in-vivo*-Prozess der Keratinozytendifferenzierung in der Haut vollständig vergleichbar ist.

Wenn die in dieser Arbeit als HPV16E6-reguliert identifizierten und mit der Apoptose in Zusammenhang gebrachten Klone in der Zervixkarzinogenese relevant sein sollten, müssen apoptotische Prozesse nicht nur *in vitro*, sondern auch *in vivo* bei der terminalen Differenzierung der Keratinozyten eine Rolle spielen.

Neben Publikationen, die sich mit der Differenzierung von Keratinozyten *in vitro* beschäftigen, gibt es nur wenige Publikationen, die sich mit der terminalen Differenzierung von Keratinozyten *in vivo* auseinandersetzen. Diese behandeln vor allem die terminale Differenzierung von Keratinozyten der normalen Haut und deren Veränderung im pathologischen Geschehen dermalen Erkrankungen. Die Symptome der Loricrin Keratoderma, einer Erkrankung der Haut, sind z.B. auf ein mutiertes Loricrin-Gen und infolgedessen auf ein verändertes apoptotisches Verhalten der Zellen in der Haut zurückzuführen (Ishida-Yamamoto *et al.* 1998 und 1999). An dieser Stelle soll deswegen vor allem auf die Differenzierungsprozesse von Keratinozyten der normalen Haut eingegangen und die Verbindung zum apoptotischen Geschehen hergestellt werden.

In den 90er-Jahren konnten klare Parallelen der terminalen Differenzierung mit der Apoptose aufgezeigt werden. Innerhalb der Differenzierung proliferieren normale Keratinozyten der menschlichen Epidermis in der basalen epidermalen Schicht (Stratum basale), durchlaufen das Differenzierungsprogramm und den apoptotischen Zelltod im Stratum spinosum und in der granulären Schicht (Stratum granulosum), bevor zum Schluss die Hornschicht (Stratum corneum) gebildet wird (Tomkova *et al.* 1999). Während dieses Prozesses der normalen Keratinozyten-

Differenzierung werden differenzierungsassoziierte Proteine wie z.B. Transglutaminase Typ 1, Cornifin, Involucrin und Keratin 1 und 10 im Stratum spinosum und Stratum granulosum exprimiert, wogegen die Loricrin- und Filaggrin-Expression (Apoptose-assoziierte Proteine) auf das Stratum granulosum beschränkt ist (Tomkova *et al.* 1999). Indem Tamada *et al.* (1994) die für die Apoptose typische DNA-Fragmentierung im Zellkern nachwiesen, zeigten sie, dass apoptotische Prozesse in normaler Haut zu beobachten sind. Auch Laporte *et al.* (2000) wiesen apoptotische Prozesse in der normalen Haut nach. Ergänzend wurde gezeigt, dass sich die Expression von mit dem apoptotischen Geschehen in Zusammenhang gebrachten Proteinen während der Keratinozytendifferenzierung *in vivo* verändert. Das proapoptotische Protein BAX spielt bei der Zelldifferenzierung *in vivo* und *in vitro* eine Rolle. Tomkova *et al.* (1999) zeigten, dass Bax *in vitro* infolge der Auslösung der Differenzierung durch Serum- und Kalziumstimulation verstärkt exprimiert wurde. *In vivo* ist die Expression des proapoptotischen Proteins BAX im Stratum granulosum und Stratum spinosum im Vergleich zum Stratum basale analog dazu schwach erhöht (Tomkova *et al.*, 1999). Ein Protein, welches spezifisch im apoptotischen Prozess exprimiert wird, ist Profilaggrin. Dieses Protein wird in der terminalen Differenzierung proteolytisch gespalten. Das Filaggrin, welches durch diese Spaltung gebildet wird, aggregiert mit Keratinfilamenten und ist damit an der Keratinisierung der Zelle beteiligt. Transfektionsexperimente zeigten, dass der apoptotische Zelltod durch Filaggrin initiiert werden kann (Ishida-Yamamoto *et al.* 1999).

Ähnlich umfangreiche Untersuchungen liegen für das Differenzierungsgeschehen in der zervikalen Mukosa nicht vor. Es gibt jedoch einige Hinweise, dass auch das Differenzierungsprogramm in der zervikalen Mukosa mit Apoptose verbunden ist. In der normalen Mukosa konnten Gandarillas *et al.* (1999) mit der TUNEL-Methode zeigen, dass in der granulären Schicht der Haut apoptotische Zellkerne zu detektieren waren. Es ist weiterhin bekannt, dass das Zervixkarzinom mit einem veränderten apoptotischen Verhalten assoziiert ist. Nair *et al.* (1999) zeigten, dass HR-HPV-Typ-Infektionen mit einer schwächeren Apoptose und einer erhöhten Zellteilungsrate verknüpft sind. Außerdem ist bekannt, dass die Karzinogenese oft mit einer Tumorphypoxie assoziiert ist. Eine Zellumgebung mit einem niedrigeren Sauerstoffpartialdruck induziert normalerweise die Apoptose in Zellen. Durch HPV16 wird das apoptotische Programm sowohl *in vitro* im Zellkultursystem (Kim *et al.* 1997) als auch *in vivo* im Zervixkarzinom (Höckel *et al.* 1999) dereguliert. Es erfolgt eine Selektion von hypoxieinduzierten apoptoseresistenten Zellen (Kim *et al.* 1997, Höckel *et al.* 1999). In besonders aggressiven Zervixkarzinomen mit schlechter Prognose ist die Tumorphypoxie mit einem niedrigen apoptotischen Index verbunden (Höckel *et al.* 1999).

4.3.4 Allgemeine Einordnung der identifizierten Klone ins apoptotische Geschehen

Neben den durch Alfandari *et al.* (1999) und Nees *et al.* (2000 und 2001) bereits als HPV16E6-reguliert identifizierten Genen (Pkt. 4.1) konnten in dieser Arbeit noch zahlreiche neue Gene und Gengruppen detektiert werden, deren Expression auf transkriptioneller Ebene durch HPV16E6 verändert wurde. In Tab. 4/3 sind die identifizierten Klone, die bereits bekannten Genen

zugeordnet werden konnten bzw. für die ein hoher Homologiegrad zu bekannten Genen zu verzeichnen war, in funktionelle Gruppen eingeordnet. Viele Gene konnten gut mit dem apoptotischen (bzw. antiapoptotischen) Geschehen in Verbindung gebracht werden (Tab. 4/3).

Es ist davon auszugehen, dass viele Veränderungen der HPV16E6-bedingten differentiellen Genexpression p53-abhängig sind. P53 ist das am besten charakterisierte Tumorsuppressorprotein. Es spielt in der Regulation des Zellzyklusses und des Zelltods eine Schlüsselrolle. Die Wildtypvariante von p53 ist ein labiles Protein mit kurzer Halbwertszeit. Intaktes p53 und intakte Signaltransduktionswege, die p53 für seine Effekte nutzt, sind für einen normalen Ablauf der Zellentwicklung wichtig. Kommt es zu Veränderungen, kann u.a. Krebs entstehen. Es wird vermutet, dass etwa 50 % aller Tumoren auf Mutationen von p53 zurückzuführen sind. Im Zervixkarzinom können dagegen nur selten p53-Mutationen beobachtet werden (Denk *et al.* 2001, Pinheiro und Villa 2001). HPV inaktiviert p53, indem das E6-Protein der HR-HPV-Typen in Kooperation mit E6AP direkt p53 binden kann. Durch diese Bindung wird p53 der Ubiquitin-vermittelten Proteolyse zugeführt. Die p53-Halbwertszeit wird zusätzlich verkürzt. HPV benutzt außerdem weitere Strategien, um die Funktionen von p53 zu inhibieren. So konnte durch Patel *et al.* (1999) gezeigt werden, dass E6 direkt an die Koaktivatoren CBP und p300 des DNA-bindenden Transkriptionsfaktors p53 binden kann. CBP und p300 sind bedeutende Proteine für den normalen Ablauf der Differenzierung und der Zellzyklusprogression. E6 von HPV16 interagiert mit C/H1, C/H3 und dem C-Terminus sowohl von CBP als auch von p300. Dies erfolgt direkt und unabhängig von p53 (Patel *et al.* 1999). Das E6-Protein des LR-HPV-Typs 6 bindet nicht an C/H3 oder den C-Terminus. Es bindet jedoch mit einer 50 %igen Effizienz von HPV16 an C/H1. HPV16E6 inhibiert durch die Bindung die transkriptionelle Aktivität von CBP/p300 und senkt die Möglichkeit von p300, p53- und NF- κ B-regulierte Promotoren zu aktivieren.

Eine weitere Möglichkeit, p53 zu deaktivieren bzw. in seiner Wirkungsweise zu beeinflussen, ist seine direkte Bindung. Grigorian *et al.* (2001) erbrachten den Beweis, dass Calvasculin (B071 1.Klon)¹ direkt p53 in vivo und in vitro binden kann. Dadurch wurde die Vermutung bestätigt, dass Calvasculin die Eigenschaft hat, das p53-Tumorsuppressorprotein abzukapseln und damit unbrauchbar zu machen (Sherbet und Lakshmi 1998).

P21 (44/3 1.K. und A091 1.K.) ist eins der am häufigsten untersuchten Proteine innerhalb der Zervixkarzinogenese. P21 wird in terminal differenzierten Zellen einer Vielzahl von Geweben in einer p53-abhängigen Weise exprimiert. Eine Überexpression von p21 resultiert in einem G1-Arrest und führte in eine Suppression des Tumorwachstums in vitro und in vivo (Gartel *et al.* 1996). Die Transkription des p21-Gens kann ebenfalls durch einen p53-unabhängigen Mechanismus aktiviert werden (Gartel *et al.* 1996). Wie durch Nees *et al.* (2000 und 2001) konnte auch innerhalb dieser Arbeit gezeigt werden, dass p21 durch HPV16E6 auf transkriptioneller Ebene differentiell exprimiert wurde.

¹ Die in dieser Arbeit identifizierten Klone werden im Folgenden im Text hinter den bekannten und charakterisierten Genen, zu denen sie Homologien aufweisen, in Klammern unterstrichen angegeben.

Besonders interessant war der erstmalige Nachweis der differentiellen transkriptionellen Expression des mitochondrialen Genoms innerhalb der in dieser Arbeit durchgeführten Transkriptionsstudien (Klone siehe Tab. 4/3). Damit konnte gezeigt werden, dass HPV auch den apoptotischen Mechanismus modifiziert, an dem die Mitochondrien beteiligt sind. Neben diesen Daten gibt es in der Literatur nur eine einzige Publikation, die zeigt, dass mitochondriale Komponenten mit HPV16E6 wechselwirken und dabei apoptotische Prozesse modifizieren (Brown *et al.* 1997). Über welchen Mechanismus das HPV16E6-Onkoprotein die Mitochondrien beeinflusst, ist noch unbekannt. Er könnte jedoch ebenfalls p53-abhängig sein, da Regula und Kirshenbaum (2000) mit Hilfe einer nicht mehr zur DNA-Bindung und damit zur Transaktivierung fähigen p53-Mutante zeigten, dass p53 den mitochondrialen apoptotischen Weg aktiviert.

In den Mitochondrien sind einige Proteine lokalisiert, die an der Apoptose beteiligt sind (Susin *et al.* 1998, Gajkowska *et al.* 2001). So handelt es sich bei dem bekannten antiapoptotischen Protein BCL2 um ein u.a. mitochondrial lokalisiertes Protein. Ein weiterer Vertreter der an der Apoptose beteiligten mitochondrialen Proteine ist Cytochrom C, eine essentielle Komponente der Atmungskette. Es ist normalerweise im intermembranalen Raum lokalisiert. Andere Proteine, die im Intermembranraum der Mitochondrien vorkommen, gehören zu den Caspasen. Caspase-2, Caspase-3 und Caspase-9 können aus den Mitochondrien in das Cytosol entlassen werden. Dort werden sie durch proteolytische Spaltung aktiviert und lösen eine Kaskade von Aktivierungen anderer Caspasen und/oder die apoptotische Degradation der Zelle aus.

Mitochondrien spielen neben der Lokalisation wichtiger antiapoptotischer und apoptotischer Proteine auch noch aus einem zweiten Grund im apoptotischen Prozessen eine zentrale Rolle. Der Eintritt in den Zellzyklus benötigt Energie in Form von ATP für die Durchführung einer Anzahl von regulatorischen und metabolischen Ereignissen. Die Proteinsynthese setzt eine große Energiemenge voraus und ist für den Eintritt der Zelle in die S-Phase des Zellzyklusses notwendig (Brooks 1977). Nach Serumstimulation von 3T3-Fibroblasten stieg der zelluläre Protein-Gehalt innerhalb von 4-5 Stunden an, und es kam zur DNA-Replikation während der S-Phase über mehrere Stunden (Tiercy und Weil 1983). Nichttoxische Inhibition der mitochondrialen Atmung in HL-60 Zellen inhibierte die Zellzyklus-Progression zur S-Phase mit einer parallelen Reduktion des intrazellulären ATP-Gehaltes (Sweet and Singh 1995).

Verschiedene Studien zur Karzinogenese zeigten, dass verschiedene mitochondrial kodierte RNAs in transformierten Zellen stärker exprimiert werden als in den Kontrollzellen. Sharp *et al.* (1992) stellten fest, dass das mitochondrial kodierte Gen für die Untereinheit 2 der Cytochromoxidase (COII) signifikant erhöht in Karzinomen exprimiert wird. Eine verstärkte Expression von COII korrelierte dabei mit einem abnehmenden Differenzierungsgrad der Karzinome. Heerdt *et al.* (1990) fanden ein reduziertes Niveau von COIII-mRNA (Cytochromoxidase Untereinheit 3) in Kolonkarzinomen.

Neben den durch das mitochondriale Genom kodierten Transkripten für mitochondriale Proteine konnten in dieser Arbeit auch nukleär kodierte Transkripte als HPV16E6-reguliert identifiziert werden, die mitochondriale Membranbestandteile verschlüsseln. Das „ADP/ATP-Carrier-Protein“ (B02a) ist in der inneren Membran der Mitochondrien lokalisiert (Walker und Runswick 1993). Dieses Protein nimmt Einfluss auf die ATP-Produktion (Atlante *et al.* 1998). Im Hefesystem wurde gezeigt, dass die inorganische Pyrophosphatase (24A/1 10.K. und 46/4 1.K.) an der Aufrechterhaltung des Transmembranpotentials beteiligt ist (Pereira-da-Silva *et al.* 1993). Dieses Protein ist ebenfalls in den Mitochondrien lokalisiert.

Drei Mitglieder der Koagulations- oder Blutgerinnungskaskade konnten als HPV16E6-reguliert identifiziert werden. Sie spielen höchstwahrscheinlich bei der Angiogenese während der Karzinogenese eine wichtige Rolle. Es handelt sich dabei um den humanen Gewebefaktor (U5 6.K.), Kallikrein 5 (36/3 2.K.) und Kallikrein 10 (S1 10.K.).

Der menschliche Gewebefaktor gehört zu den Transmembranproteinen. Er ist aus einer 219 AS-Reste langen extrazellulären Domäne, einem 23 AS-Reste langen Transmembranbereich sowie einer 21 AS-Reste langen intrazellulären Domäne aufgebaut (Ruf und Edgington 1994). Neben seiner Funktion in der Blutgerinnungskaskade spielt der Gewebefaktor bei der embryonalen vaskulären Entwicklung, der Angiogenese und der Tumorzell-Metastasierung eine wichtige Rolle. In welchem Zusammenhang die Funktionen des Gewebefaktors bei der Blutgerinnungskaskade bzw. der Angiogenese stehen, ist heute noch umstritten. Bereits 1865 berichtete Trousseau jedoch, dass die Aktivierung der Koagulationskaskade und die Thromboseentstehung ein häufiges Ereignis im Krebsgeschehen sind (Ruf und Mueller 1996). Die klinische Assoziation von Thrombose mit Malignität ist als „Trousseau's Syndrom“ bekannt. Dieses Syndrom ist eine Folge der erhöhten Expression des humanen Gewebefaktors in malignen Tumoren (Ruf and Mueller 1996). Verschiedene aktuelle klinische Studien bestätigen diese historischen Beobachtungen. Thrombotische Ereignisse kommen bei ungefähr 15 Prozent der Krebspatienten vor (Sack *et al.* 1977, Sun *et al.* 1979).

Tumorzellen exprimieren den humanen Gewebefaktor regelmäßig. In menschlichen Tumoren korreliert die Gewebefaktorexpression räumlich mit der Neubildung von Gefäßen. Das zeigt, dass der Gewebefaktor in die Gefäßbildung bei malignen Tumoren involviert ist. Seine Expression ist mit der malignen Transformation in Adenokarzinomen der Pankreas assoziiert (Kakkar *et al.* 1995). Die Gewebefaktor-Expression ist ein molekularer Marker für die maligne Angiogenese in humanen Mammakarzinomen (Contrino *et al.* 1996).

Kallikreine sind eine Untergruppe von Serinproteasen mit verschiedenen physiologischen Funktionen. Wachstumsexperimente zeigten, dass viele Kallikreine bei der Karzinogenese eine Rolle spielen (Yousef *et al.* 2000). Kallikrein 10 ist ein relativ spät charakterisiertes Mitglied der Kallikrein-Multigenfamilie. Luo *et al.* 2001 zeigten, dass es als Tumorsuppressor agiert und bei der Ovarialkarzinogenese eine Rolle spielt. Kallikrein 5 wurde als Progressionsmarker beim Ovarialkarzinom charakterisiert (Kim *et al.* 2001).

Der Vaskuläre Endotheliale Zell-Wachstumsfaktor (VEGF = engl. **V**ascular **E**ndothial **G**rowth **F**actor) (E09b) ist ein multifunktionales Zytokin, welches u.a. bei normalen Entwicklungsprozessen, bei Krebs und weiteren Krankheiten eine wichtige Rolle spielt. Der Vaskuläre Endotheliale Zell-Wachstumsfaktor (VEGF) ist als einer der bedeutendsten Induktoren der Angiogenese bekannt und wird verstärkt in Karzinomen der Zervix exprimiert (Lopez-Ocejo *et al.* 2000). Lopez-Ocejo *et al.* 2000 zeigten, dass das Onkoprotein HPV16E6 den VEGF-Genpromotor in einer p53-unabhängigen Weise aktiviert. Dadurch wird die Transkription dieses Gens aktiviert. Aufgrund von Deletionsstudien des VEGF-Promotors wurde durch Lopez-Ocejo *et al.* (2000) vermutet, dass es zur direkten Bindung von HPV16E6 an den Promotor kommt.

NF- κ B (C04k) spielt bei der transkriptionellen Induktion von vielen immunomodulatorischen Genen eine Rolle (MHC Klasse 1, Adhäsionsmoleküle, Zytokine u.a.). Es liegt normalerweise im inaktiven Zustand mit seinem Inhibitormolekül I- κ B assoziiert im Zytoplasma vor. Als Antwort auf eine Reihe von Stresssignalen (z.B. Lipopolysaccharide, Tumor-Nekrose-Faktor, IL-1 und viraler doppelsträngige RNA) wird I- κ B durch die Ribosomale-Protein-S6-Kinase (B13d) phosphoryliert und über einen Ubiquitin-abhängigen Weg abgebaut. NF- κ B wird freigesetzt, tritt in den Zellkern ein und aktiviert die Transkription zahlreicher Gene. NF- κ B bindet u.a. den IFN- β -Promotor als Teil eines Multiprotein-Transkriptionsunterstützenden-Komplexes. Dieser Komplex beinhaltet unter anderem einen Faktor, welcher die positiv regulatorische Domäne 1 vom IFN- β Promotor bindet. Dabei handelt es sich um ein Mitglied der Interferon Regulatorischen Faktoren (IRF). Um welchen Vertreter der IRF es sich genau handelt, ist umstritten. Möglich ist auch, dass verschiedene Mitglieder dieser Familie die gleiche Funktion übernehmen können. Dies würde verhindern, dass ein Virus die Transkription von IFN- β durch eine einzige Interaktion ausschalten könnte. Für das E6-Protein von HPV16 wurde z.B. beschrieben, dass es IRF-3 bindet und dadurch die IFN-Transkription verhindert kann (Ronco *et al.* 1998). Die Genexpression ist dabei jedoch nicht vollständig blockiert. Ronco *et al.* (1998) schlussfolgerten, dass die Funktion von IRF-3 durch andere Proteine substituiert werden kann. Innerhalb dieser Arbeit konnte für den über die ATLASTM-cDNA-Array identifizierten Klon (C13k 1.Klon) (kodiert für IRF-6) gezeigt werden, dass die Transkription von IRF-6 durch HPV16E6 verändert werden kann.

Rapamycin stellt ein wichtiges Therapeutikum gegen Krebs dar. Es bindet an das intrazelluläre FK506-bindende-Protein (23/1 3.K.). Dadurch wird die Aktivität der Kinase mTOR inhibiert, was wiederum zur Inhibition der Ribosomalen-Protein-S6-Kinase (B13d) führt (Hidalgo und Rowinsky 2000). Die Ribosomale-Protein-S6-Kinase gehört zu den MAPKs (engl. = Mitogen Activated Protein Kinases) und spielt somit bei der Regulation von zellulären Vorgängen der Proliferation, der Zelldifferenzierung und Apoptose eine Rolle (Frodin und Gammeltoft 1999). In der Brustkrebszelllinie MCF-7 liegt die Ribosomale-Protein-S6-Kinase amplifiziert vor und wird stark überexprimiert (Barlund *et al.* 2000). Es konnte eine statistisch signifikante schlechte

Überlebensprognose für Brustkrebs-Patientinnen mit Genamplifikationen des S6K-Gens gezeigt werden (Barlund *et al.* 2000).

Neben der Ribosomalen-Protein-S6-Kinase konnten in dieser Arbeit noch die ribosomalen Proteine S6 (S2 1.K.) und L27a (54/2* 2.K.) als HPV16E6-reguliert identifiziert werden. S6 ist das Haupts substrat der Ribosomalen-Protein-S6-Kinase (B13d). Über die ribosomalen Proteine S6 und L27a ist noch wenig bekannt. Aufgrund der nachfolgend dargestellten Sachverhalte für andere Mitglieder der ribosomalen Protein-Familie kann jedoch vermutet werden, dass auch sie bei der Karzinogenese und Apoptose eine Rolle spielen. Marechal *et al.* (1994) zeigten, dass das ribosomale Protein L5 zusammen mit mdm-2 und p53 und der 5S RNA zu einem Ribonucleoprotein aggregiert. Das ribosomale Protein S29 ist als ein Induktor der Apoptose bekannt (Khanna *et al.* 2000). Transfektionsstudien zeigten, dass die Überexpression des ribosomalen Proteins S29 zu einer erhöhten Expression von p53, Caspase-3 und BAX führte, wogegen BCL2 runterreguliert wurde. Vaarala *et al.* (1998) zeigten, dass verschiedene ribosomale Proteine in Prostatakrebs-Zelllinien überexprimiert sind. Diese in den Zelllinie beobachtete Überexpression wurde durch *in-situ*-Hybridisierung für zwei Vertreter an Prostatakrebsbiopsiematerial bestätigt. Für das ribosomale Protein 2 zeigten Chiao *et al.* (1992) für verschiedene Krebsarten eine Überexpression.

Innerhalb dieser Arbeit wurden weiterhin mehrere Vertreter kalziumbindender Proteine als HPV16E6-reguliert detektiert. Die intrazelluläre Kalziumkonzentration wird in der eukaryotischen Zelle streng kontrolliert. Das ist die Voraussetzung, dass Kalziumionen als „Second Messenger“ fungieren können (Carafoli 1997). Die meisten dieser Effekte werden durch Proteine vermittelt, welche Kalzium mit einer hohen Spezifität binden können (Davis 1992).

1995 identifizierten Chen *et al.* mit Hilfe des Two-Hybrid-Systems ein EF-Hand-Protein, welches die E6-Proteine von HR-HPV-Typen spezifisch binden konnte. Es wurde als E6BP (engl. **E6 Binding Protein**) bezeichnet. Es stellte sich heraus, dass es mit dem durch Weis *et al.* (1994) identifizierten, als ERC-55 bezeichneten Protein identisch war. ERC-55 gehört zur EF-Hand-Familie der kalziumbindenden Proteine. Es hat ein Molekulargewicht von 55 kDa und ist im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert. ERC-55 besitzt sechs sich wiederholende EF-Hand-Motive (Weis *et al.* 1994).

Für zwei Mitglieder der EF-Hand-Familie (Calmodulin und Calvasculin) wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass ihre Transkription durch HPV16E6 verändert wurde. Calmodulin (33/5 1.K. und 33/6 1.K.) ist der primäre Mediator der Ca²⁺-abhängigen Signaltransduktion in eukaryotischen Zellen (Niki *et al.* 1996). S100A4, auch als Calvasculin bekannt (B07l 1.K.) ist in Zusammenhang mit der Karzinogenese bereits ein gut charakterisiertes Protein.

Eine Erhöhung des Niveaus der S100-Proteine im Serum und Tumorgewebe ist während der Tumorprogression und Metastasierung feststellbar (Sherbet und Lakshmi 1998). In Mammakarzinomen ist das Expressionsniveau von S100A4 eng mit der Eigenschaft der

Metastasierung in die umgebenden Lymphknoten verbunden (Sherbet und Lakshmi 1998, Albertazzi et al. 1998). Calvasculin spielt bei der epidermalen Differenzierung eine Rolle. Rudland et al. (2000) zeigten, dass eine Positivität für S100A4 mit der Tumorprogression verbunden ist. Wie oben bereits erwähnt, bindet Calvasculin direkt p53 (Grigorian et al., 2001).

Neben zwei Vertretern der EF-Hand-Familie konnten noch weitere kalziumbindende Proteine als HPV16E6-reguliert identifiziert werden. Calbindin (Q6 1.K.) spielt bei der Reduktion des Kalziumspiegels eine Rolle und verhindert dadurch den apoptotischen Tod von Neuronen (Wernyj et al. 1999). Calbindin blockiert den apoptotischen Zelltod in Lymphozyten (Dowd et al. 1992). Der Tumornekrosefaktor kann Calbindin in Astrozyten induzieren (Mattson et al. 1995).

Für Desmocollin 3 (54/1* 2.K.), ein weiteres Kalzium-bindendes Protein, konnte innerhalb dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass es auf transkriptionellem Niveau durch HPV16E6 verändert exprimiert wurde. Desmocollin 3 gehört zu den epidermal vorkommenden Isoformen der Desmocolline (Weiske et al. 2001). Die desmosomalen Cadherine sind für die normale Adhäsion zwischen den epithelialen Zellen essentiell. Es kann postuliert werden, dass ein Verlust dieser Proteine zu einer Eliminierung des zellulären Adhäsionsvermögens und somit zu Veränderungen in der Zelldifferenzierung führen kann.

E-Cadherin (A14a 1.K.) ist ein Ca^{2+} -abhängiges Zelladhäsionsmolekül, welches an der Zell-Zell-Interaktion beteiligt ist. E-Cadherin ist ein Mitglied der Cadherin-Proteinfamilie. Es handelt sich dabei um ein Transmembran-Glykoprotein, das auf allen epithelialen Zellen exprimiert wird. Es verbindet epitheliale Zellen über eine kalziumabhängige Interaktion miteinander. E-Cadherin spielt bei der Induktion und Aufrechterhaltung der Zelladhäsion, der Zellpolarität und der Differenzierung in vivo und in vitro eine wichtige Rolle.

Die Inhibition der E-Cadheringenexpression bzw. deren totaler Verlust ist mit einem invasiven, schwach differenzierten Phänotyp assoziiert (Wilding et al. 1996). Eine immortalisierte Keratinozytenzelllinie, welche durch eine Kotransfektion mit HPV16E6 und E7 durch diese Arbeitsgruppe regeneriert wurde, zeigte eine verminderte Expression von E-Cadherin. Wilding et al. (1996) führten eine Selektion der immortalisierten Keratinozyten nach ihrer Differenzierungsresistenz durch. Diese führte zu einer erhöhten Anzahl von Zellen mit einem invasiven Phänotyp, bei denen E-Cadherin schwächer als in den normalen Kontrollzellen exprimiert wurde. In diesen Zellen wurde parallel dazu der epidermale Wachstumsfaktor (EGF) verstärkt exprimiert. Eine Überexpression von E-Cadherin mit Hilfe eines Vektorkonstrukts führte zum reversen, primären differenzierten Phänotyp. E-Cadherin hat somit die Funktion eines Tumorsuppressorgens. Veränderungen in der E-Cadherinexpression gehören zu den am meisten beobachteten molekularbiologischen Ereignissen bei der Karzinogenese (z.B. Brustkrebs, Ovarialkrebs, Schilddrüsenkrebs u.a.). In Magenkarzinomen ist eine schlechte Prognose mit der verminderten Expression des E-Cadherins verbunden. Der Verlust bzw. die Reduktion der E-Cadherin-Expression ist mit invasivem Verhalten bei vielen Krebsarten assoziiert (El-Bahrawy und Pignatelli 1998, Christoferi und Semb 1999). Jeffers et al. (1997) und Vessey et al. (1995)

beobachteten in Zervixkarzinomen eine reduzierte Menge an membranständigem E-Cadherin, dafür jedoch erhöhte Werte an cytoplasmatischem E-Cadherin. Darai et al. (2000) konnten ebenfalls in Zervixkarzinomen eine erhöhte Anfärbbarkeit von E-Cadherin im Zytoplasma im Vergleich zu den Kontrollen feststellen.

Da sowohl E-Cadherin als auch Calmodulin als HPV16E6-reguliert identifiziert wurden, war für diese Arbeit die Publikation von Li *et al.* (1999) besonders interessant. Durch diese Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass Calmodulin und E-Cadherin um die Bindungsstelle eines Proteins (IQGAP1) konkurrieren. Analysen haben gezeigt, dass IQGAP1 auch an E-Cadherin und an β -Catenin *in vitro* und *in vivo* (Kuroda *et al.*, 1998) binden kann. Durch Li *et al.* (1999) wurde gezeigt, dass Calmodulin die Interaktion von IQGAP1 und E-Cadherin modulieren kann. Die Inhibition von Calmodulin resultiert in einer signifikanten Reduktion der E-Cadherin-vermittelten Zelladhäsion.

Hervorzuheben ist abschließend noch die differentielle Genexpression des TRAF3-interagierenden Faktors MIP-T3 (TRAF3 = engl. Tumor-Necrosis-Factor-Receptor-Associated-Factor 3) (S1 5.K.), der durch Ling und Goeddel (2000) erstmals beschrieben wurde. TNFR-assoziierte Faktoren (TRAFs) sind eine Proteinfamilie, welche ursprünglich als Signaltransduktoren der TNFR-Superfamilie entdeckt wurden (Rothe *et al.* 1994, Hu *et al.* 1994, Cheng *et al.* 1995). Bis heute sind mindestens sechs Mitglieder der TRAF-Familie identifiziert (Ling und Goeddel 2000). TRAF3 war anfangs als Molekül identifiziert, welches die zytoplasmatische Domäne des TNFR-Familienmitglieds CD40 und ebenfalls das Epstein-Barr-Virus-Protein LMP1 (Latentes Membran-Protein 1) bindet (Hu *et al.* 1994, Cheng *et al.* 1995, Mosialos *et al.* 1995, Sato *et al.* 1995). Um mehr über die physiologische Rolle von TRAF3 zu erfahren, wurde mit Hilfe des Two-Hybrid-Systems nach Proteinen gesucht, die mit TRAF3 interagieren (Ling und Goeddel 2000). Dabei wurde der Faktor MIP-T3 (engl. Microtubuli Interacting Protein) entdeckt. MIP-T3 verbindet TRAF3 mit dem mikrotubulären Netzwerk (Ling and Goeddel 2000).

Neben den oben näher charakterisierten Genen sind in dieser Arbeit noch weitere cDNAs als HPV16E6-reguliert identifiziert worden, die bekannten Genen zugeordnet werden können. In Tab. 4/3 sind alle in dieser Arbeit identifizierten cDNAs mit Homologien zu bekannten Genen aufgelistet und funktionellen Familien zugeordnet. Die wichtigsten und aussagekräftigsten Publikationen in Hinsicht auf Beteiligung an apoptotischen Prozessen, Karzinogenese, HPV, p53, Keratinozytendifferenzierung und Funktion sind in dieser Tabelle aufgeführt. Diese Auflistung zeigt, dass es sich bei den identifizierten cDNAs um sehr interessante Gene in Bezug auf die Zervixkarzinogenese handeln könnte. Alle über das „Differential Display of mRNA“ gewonnenen cDNAs und die bei der ersten Verifikationsrunde der ATLASTM-Arrays ermittelten cDNAs liegen in Plasmidvektoren kloniert vor. Zur Überprüfung der Einsatzfähigkeit dieser Gene als Progressionsmarker für das Zervixkarzinom sind *in-situ*-Hybridisierungsexperimente und eine Korrelation der Expressionsstärken mit den Vorstufen und dem Carcinoma *in situ* (CINI – CIN III) im Labor der Frauenklinik (Abt. Gynäkologische Molekularbiologie) geplant.

Tab. 4/3

Einordnung der Gene, die homologe Bereiche mit den durch HPV16E6 differentiell exprimierten „Differential Display of mRNA“-Klonen und der ATLAS™-Array-Gene haben, in funktionelle Gruppen.
 Aufführung der interessantesten Literaturstellen in Bezug auf Apoptose (A), Keratinozytendifferenzierung (D), Funktion (F), HPV-Assoziation (H) und Karzinogenese (K)

<u>Transkriptionsfaktoren</u>		
Nuclear factor kappa-B DNA binding subunit (NF-kappa B; NFkB)	C04k	A: Doostzadeh-Cizeron et al. (2000), Aoki et al. 2001, D: Ma et al. 1997, H: Fontaine et al. 2000, Nees et al. 2001, K: Mosialos (1997), Lind et al. 2001, P: Zahng et al. 2001, Saile et al. 2001
Proto-oncogene c-jun, transcriptionfactor AP-1	A01c	A: Piu et al. 2001, D: Maas-Szabowski et al. 2001, H: Kyo et al. 1997, Li et al. 1998, Soto et al. 1999, Li et al. 2000, K: Milde-Langosch et al. 2000
Fos-related antigen (FRA1)	A13c	A: Estus et al. 1994, D : Welter und Eckert (1995), F: Foletta (1996), H: Rosl et al. 1997, P: Amundson et al. 1999, K: Zajchowski et al. 2001, Yoshioka et al. (1995),

<u>Ribosomale Proteine u.ä.</u>		
Ribosomal protein S6 kinase II alpha 1	B13d	A: Frodin und Gammeltoft (1999), Harada et al. (2001), D: Efimova et al. (1998), K: Barlund et al. (2000), Shah et al. (2001), P: Hosoi et al. (1999)
Homo sapiens, Similar to ribosomal protein S6	S2 1.K.	D: Pogue-Geile et al. 1991, Lecomte et al. 1995
Ribosomal protein L27a and KIAA0298 gene	54/2*2.K.	F: Cavdar et al. (2001), Bevort und Leffers, (2000), K: Frigerio et al. (1995)

<u>IFN-regulierte Proteine</u>		
(2'-5') oligoadenylate synthetase 2	D03n	H: Nees et al. (2001), Rusconi et al. (1994), Garcia-Milia et al. (1996), Moro et al. (1998), K: Martinetti et al. (1998) P: Faiella et al. (1996)
Homo sapiens P/OKcl.4 mRNA for 2'-5' oligoadenylate synthetase 3	C2 1.K.	H: Rusconi et al. (1994), Garcia et al. (1996), Moro et al. (1998), K: Martinetti et al. (1998), P: Faiella et al. (1996)
Homo sapiens similar to NS1-associated protein 1	N1 1.K.	F : Harris et al. (1999) A: Thiede et al. 2001,
Homo sapiens, interferon induced transmembraneprotein 1 (9-27),	47/5 1.K.	F: Deblandre et al. (1995), H: Nees et al. (2001), K: Evans et al. (1990),
Interferon regulatory factor 6, IRF 6	C13k 1.K.	

<u>Mitochondriale Proteine</u>		
Homo sapiens IDL RNA	46/4 4.K.	F: Duncan et al. (2000), K: Duncan et al. (2000)
Mitochondriales Gen: t-RNA ^{Pro} - D-Loop	Q1 2.K. 44/1 1.K. 44A/1* 1.K. 44/1 4.K.	F : Duncan et al. (2000), K : Burgart et al. (1995), Jeronimo et al. (2001)
Homo sapiens inorganic pyrophosphatase 1	24A/110.K., 46/4 1.K.	A: Pereira-da-Silva et al. (1993), Meleti et al. (2000)
16S ribosomal RNA (mitochondrial)	36/1 3.K. 44/2 1.K. 47/4 1.K. 44/2 3.K.	K : Mahajan (1994)
Mitochondrial NADH dehydrogenase Subunit 5	47/3 4.K.	A: Wong et al. (2000), K: Jeronimo et al. (2001), Shatton et al. (1983), Corral et al. (1989), P: Asher et al. (2001)
ADP/ATP carrier protein	B02a	F : Klingenberg (1975), Shin et al. (2000), Walker und Runswick (1993), K : Heddi et al. (1996)

ATP synthetase coupling factor 6 mitochondrial precursor	B04a	F: Javed et al. (1991), Gurrierri et al. (1991)
12S ribosomal RNA (mitochondrial)	48/1 7.K. 12/3 1.K.	
Mitochondriales Gen: tRNAs: Ala,Asn	Q6* 1.K.	
Mitochondrial NADH dehydrogenase Subunit 2	S3 1.K.	
Cytochrome Oxidase Subunit 1 + t-RNA Ser (mitochondrial)	48/1 1.K.	

Kalziumbindende Proteine

Calvasculin	B07d 1.K.	K: Albertazzi et al. (1998), Maclandsmo et al. (1997), Takenaga et al. (1997), Kimura et al. (2000), Sherbet und Lakshmi (1998), Takenaga et al. (1997), P: Grigorian et al. (2001)
E-cadherin	A14a 1.K.	D: Owens et al. (2000), F: Bussemakers et al. (1993), K: Darai et al. (1999), Wilding et al. (1996), Carico et al. (2001), Kimura et al. (2000), Cristoferi und Semb (1999), Berx et al. (1998),
Homo sapiens calmodulin 2	33/5 1.K., 33/6 1.K.	A: Tombal et al. (2000), D: Grief et al. (1989), Rosenthal et al. (2000), Piao et al. (2001), H: Johnston et al. (1999), Rosenthal et al. (2000), K: Tombal et al. (2000), Sohm et al. (1999), P: Ray et al. (2001)
Homo sapiens desmocollin 3 (DSC3), transcript variant Dsc3b, mRNA	54/1* 2.K.	A: Weiske et al. (2001), D: Henkler et al. (2001), F: Hanakawa et al. (2000), K: Klus et al. (2001)
Homo sapiens calbindin 2, (29kD, calretinin)	Q6 1.K.	A: Wernyi et al. (1999), Mattson et al. (1995), Dowd et al. (1992), K: Gatzos et al. (1996)
Homo sapiens calpastatin (CAST), mRNA	47/2 1.K.	A: Kato et al. (2000), Benetti et al. (2001), D: Garach-Jehoshua et al. (1998), P: Pariat et al. (1997), Gonen et al. (1997), Benetti et al. (2001)

TNF-Rezeptor assoziierte Proteine

Homo sapiens microtubule-interacting protein that associates with TRAF3; DKFZP434F124 protein (DKFZP434F124)	S1 5.K.	F: Ling und Goeddel et al. (2000)
--	---------	-----------------------------------

Proteine der Koagulationskaskade

Homo sapiens kallikrein 10 (KLK10)	S1 10.K.	K: Luo et al. (2001)
Homo sapiens kallikrein 5 (KLK5)	36/3 2.K.	K: Kim et al. (2001)
Homo sapiens coagulation factor III (thromboplastin, tissue factor)	U5 6.K.	A: Greeno et al. (1996), H: Nees et al. (2001), K: Zahng et al. (1994), Contrino et al. (1996), K: Marek et al. (1999), Lwalled et al. (2000)
Vascular endothelial growth factor precursor (VEGF), vascular permeability factor (VPF)	E09b	A: de Jong et al. (2001), D: Viac et al. (1997), H: Lopez-Ocejo et al. (2000), Wei et al. (2001), K: Doldi et al. (1996), P: Lopez-Ocejo et al. (2000), Linderholm et al. (2001), Koide et al. (2001)

Zellzyklus-Proteine

Homo sapiens, cyclin-dependent kinaseinhibitor 1A (p21, Cip1)	44/3 1.K. A09l 1.K.	D: Paramio et al. (2001), Santani et al. (2001), H: Nees et al. (2000 und 2001), Lie et al. (1999), Rorke et al. (2000), K: Lie et al. (1999), Gao et al. (1997), P: Gartel et al. (1996),
---	------------------------	--

Proteine des Zytoskeletts u.ä.

Homo sapiens, actin, gamma 1	36/1 4.K.	
Brain-specific tubulin alpha 1 subunit (TUBA 1)	G29	D: Danno et al. (1983)
Ezrin, cytovillin 2, villin 2 (VIL2)	A03b	F: Bretscher et al. (1997), Hiscox und Jiang (1999), K: Bohling et al. (1996)
Homo sapiens laminin, gamma 2 (nicein (100kD),	24B/1 1.K.	D: Fleischmajer et al. (2000), K: de Iorio et al. (2001)

Zellmembran-assoziierte Proteine

Homo sapiens sterol-C4-methyl oxidase-like (SC4MOL), mRNA	22/1 4.K.	
Caveolin-1	B04k	A: Timme et al. (2000), Liu et al. (2001), D: Campbell und Gumbleton (2000): Schlegel et al. (1998), H: Razani et al. (2000), K: Davidson et al. (2001), Fine et al. (2001), Razani et al. (2001), P: Razani et al. (2000),

Differenzierungsmarker

Human S protein	54/3* 3.K.	F: Zhou und Chaplin (1993), D: Zhou und Chaplin (1993)
-----------------	------------	--

Endoplasmatisches Retikulum-assoziierte Proteine

FK506-binding protein	23/1 3.K.	A: Friberg et al. (1998), Higashigawa et al. (1997), Hidalgo und Rowinsky (2000), D: Nishio et al. (2000), K: Ward et al. (1999), Kumar et al. (2001)
TRAM	F09h 1.K.	F: Hegde et al. (1998), Gorlich et al. (1992)

Kinasen u.ä.

Tyrosine kinase receptor AXL-oncogen	A07d 1.K.	A: Lee et al. (1999), Demarchi et al. (2001), F: O'Bryan et al. (1995), K: Craven et al. (1995), Challier et al. (1996), Rochlitz et al. (1999)
PTPCAAX 1	B08h 1.K.	F: Peng et al. (1999), H: Tsujamoto et al. (1999), K: Cates et al. (1996)

Andere

Guanylate kinase (GMP kinase)	B12m	F: Fitzgibbon et al. (1996)
BTG2	A10n	P : Rouault et al. (1998), Puisieux und Magaud (1999) Cortes et al. (2000) , Kannan et al. (2001) A : Fiedler et al. (1998) K : Ficazzola et al. (2001)
RHOHP1	B11j 1.K.	F : Ridley et al. (1997)

5 Literaturverzeichnis

- Albertazzi E, Cajone F, Leone BE, Naguib RN, Lakshmi MS, Sherbet GV (1998)**
Expression of metastasis-associated genes h-mts1 (S100A4) and nm23 in carcinoma of breast is related to disease progression. *DNA Cell Biol.* Apr;17(4):335-42
- Alfandari J, Shnitman Magal S, Jackman A, Schlegel R, Gonen P, Sherman L (1999)**
HPV16E6 oncoprotein inhibits Apoptosis induced during Serum Calcium Differentiation of foreskin Human Keratinocytes. *Virology.* 257: 383 - 96
- Alloul N und Sherman L (1999)** Transcription modulatory activities of differentially spliced cDNAs encoding the E2 protein of human papillomavirus type 16. *J Gen Vir.* 80: 2461 – 70
- Airenne T, Haakana H, Sainio K, Kallunki T, Kallunki P, Sariola H, Tryggvason K (1996)** Structure of the human laminin gamma 2 chain gene (LAMC2): alternative splicing with different tissue distribution of two transcripts. *Genomics.* Feb 15;32(1):54-64
- Amundson SA, Bittner M, Chen Y, Trent J, Meltzer P, Fornace AJ Jr. (1999)**
Fluorescent cDNA microarray hybridization reveals complexity and heterogeneity of cellular genotoxic stress responses. *Oncogene.* Jun 17;18(24):3666-72
- Aoki M, Nata T, Morishita R, Matsushita H, Nakagami H, Yamamoto K, Yamazaki K, Nakabayashi M, Ogihara T, Kaneda Y (2001)** Endothelial apoptosis induced by oxidative stress through activation of NF-kappaB: antiapoptotic effect of antioxidant agents on endothelial cells. *Hypertension.* Jul;38(1):48-55
- Asher G, Lotem J, Cohen B, Sachs L, Shaul Y (2001)** Regulation of p53 stability and p53-dependent apoptosis by NADH quinone oxidoreductase 1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jan 30;98(3):1188-93
- Atlante A, Seccia TM, Pierro P, Vulpis V, Marra E, Pirrelli A, Passarella S (1998)**
ATP synthesis and export in heart left ventricle mitochondria from spontaneously hypertensive rat. *Int J Mol Med.* Apr;1(4):709-16
- Ausubel FM (1991)** Short protocols in molecular biology: a compendium of methods from current protocols in molecular biology/ ed. Board, New York: Wiley
- Baker CC, Phelps WC, Lindgren V, Braun MJ, Gonda MA, Howley PM (1987)**
Structural and transcriptional analysis of human papillomavirus type 16 sequences in cervical carcinoma cell lines. *J Virol.* Apr;61(4):962-71
- Band V, De Caprio JA, Delmolino L, Kulesa V, Sager R (1991)** Loss of p53 protein in human papillomavirus type 16 E6-immortalized human mammary epithelial cells. *J Virol.* Dec;65(12):6671-6
- Barber GN (2001)** Host defense, viruses and apoptosis. *Cell Death Differ.* Feb;8(2):113-26
- Barbosa MS, Lowy DR, Schiller JT (1989)** Papillomavirus polypeptides E6 and E7 are zinc-binding proteins. *J Virol.* 63 1404 – 7

- Barlund M, Monni O, Kononen J, Cornelison R, Torhorst J, Sauter G, Kallioniemi P, Kallioniemi A (2000)** Multiple genes at 17q23 undergo amplification and overexpression in breast cancer. *Cancer Res.* Oct 1;60(19):5340-4
- Bauer D, Muller H, Reich J, Riedel H, Ahrenkiel V, Warthoe P, Strauss M (1993)** Identification of differentially expressed mRNA species by an improved display technique (DDRT-PCR). *Nucleic Acids Res.* Sep 11;21(18):4272-80
- Benetti R, Del Sal G, Monte M, Paroni G, Brancolini C, Schneider C (2001)** The death substrate Gas2 binds m-calpain and increases susceptibility to p53-dependent apoptosis. *EMBO J.* Jun 1;20(11):2702-14
- Benson JD und Howley PM (1995)** Amino-terminal domains of the bovine papillomavirus type 1 E1 and E2 proteins participate in complex formation. *J Virol.* Jul;69(7):4364-72
- Bernard BA, Bailly C, Lenoir MC, Darmon M, Thierry F, Yaniv M (1989)** The human papillomavirus type 18 (HPV18) E2 gene product is a repressor of the HPV18 regulatory region in human keratinocytes. *J Virol.* Oct;63(10):4317-24
- Berx G, Nollet F, van Roy F (1998)** Dysregulation of the E-cadherin/catenin complex by irreversible mutations in human carcinomas. *Cell Adhes Commun.* 6(2-3):171-84. Review
- Bevort M und Leffers H (2000)** Down regulation of ribosomal protein mRNAs during neuronal differentiation of human NTERA2 cells. *Differentiation.* Oct;66(2-3):81-92
- Birnboim HC und Doly J (1979)** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* Nov 24;7(6):1513-23
- Blitz IL und Laimins LA (1991)** The 68-kilodalton E1 protein of bovine papillomavirus is a DNA binding phosphoprotein which associates with the E2 transcriptional activator in vitro. *J Virol.* Feb;65(2):649-56
- Bohling T, Turunen O, Jaaskelainen J, Carpen O, Sainio M, Wahlstrom T, Vaheri A, Haltia M (1996)** Ezrin expression in stromal cells of capillary hemangioblastoma. An immunohistochemical survey of brain tumors. *Am J Pathol.* Feb;148(2):367-73
- Bold RJ, Virudachalam S, McConkey DJ (2001a)** BCL2 expression correlates with metastatic potential in pancreatic cancer cell lines. *Cancer.* Sep 1;92(5):1122-9
- Bold RJ, Virudachalam S, McConkey DJ (2001b)** Chemosensitization of pancreatic cancer by inhibition of the 26S proteasome. *J Surg Res.* Sep;100(1):11-7
- Boshart M, Gissmann L, Ikenberg H, Kleinheinz A, Scheurlen W, zur Hausen H (1984)** A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. *EMBO J.* : 1151 – 7
- Boyce ST und Ham RG (1983)** Calcium regulated differentiation of normal human epidermal keratinocytes in chemically defined clonal cultures and serum free serial cultures. *J Invest Dermatol.* 81: 33 – 40
- Bretscher A, Reczek D, Berryman M (1997)** Ezrin: a protein requiring conformational activation to link microfilaments to the plasma membrane in the assembly of cell surface structures. *J Cell Sci.* Dec;110 (Pt 24):3011-8. Review

- Broe M, Shepherd CE, Milward EA, Halliday GM (2001)** Relationship between DNA fragmentation, morphological changes and neuronal loss in Alzheimer's disease and dementia with Lewy bodies. *Acta Neuropathol (Berl)*. Jun;101(6):616-24
- Brooks RA (1977)** A quantitative theory of the Hounsfield unit and its application to dual energy scanning. *J Comput Assist Tomogr*. Oct;1(4):487-93
- Brown J, Higo H, McKalip A, Herman B (1997)** Human papillomavirus (HPV) 16 E6 sensitizes cells to atractyloside-induced apoptosis: role of p53, ICE-like proteases and the mitochondrial permeability transition. *J Cell Biochem*. Aug 1;66(2):245-55
- Burgart LJ, Zheng J, Shu Q, Strickler JG, Shibata D (1995)** Somatic mitochondrial mutation in gastric cancer. *Am J Pathol*. Oct;147(4):1105-11
- Bussemakers MJ, van Bokhoven A, Mees SG, Kemler R, Schalken JA (1993)** Molecular cloning and characterization of the human E-cadherin cDNA. *Mol Biol Rep*. Feb;17(2):123-8
- Campbell Lund Gumbleton M (2000)** Aberrant caveolin-1 expression in psoriasis: a signalling hypothesis. *IUBMB Life*. Dec;50(6):361-4
- Carafoli (1997)** Intracellular calcium homeostasis. *Annu Rev Biochem*. 56:395-433. Review
- Carico E, Atlante M, Bucci B, Nofroni I, Vecchione A (2001)** E-cadherin and alpha-catenin expression during tumor progression of cervical carcinoma. *Gynecol Oncol*. Feb;80(2):156-61
- Carmichael JA und Maskens PD (1989)** Cervical dysplasia and human papillomavirus. *Am J Obstet Gynecol*. 160 916 – 8
- Cates CA, Michael RL, Staybrook KR, Harvey KA, Burke YD, Randall SK, Crowell PL, Crowell DN (1996)** Prenylation of oncogenic human PTP(CAAX) protein tyrosine phosphatases. *Cancer Lett*. Dec 20;110(1-2):49-55
- Cavdar Koc E, Burkhardt W, Blackburn K, Moseley A, Spremulli LL (2001)** The small subunit of the mammalian mitochondrial ribosome. Identification of the full complement of ribosomal proteins present. *J Biol Chem*. Jun 1;276(22):19363-74
- Chalifour LE, Fahmy R, Holder EL, Hutchinson EW, Osterland CK, Schipper HM, Wang E (1994)** A method for analysis of gene expression patterns. *Anal Biochem*. Feb 1;216(2):299-304
- Challier C, Uphoff CC, Janssen JW, Drexler HG (1996)** Differential expression of the ufo/axl oncogene in human leukemia-lymphoma cell lines. *Leukemia*. May;10(5):781-7
- Chang YE und Laimins LA (2000)** Microarray analysis identifies interferon-inducible genes and Stat-1 as major transcriptional targets of human papillomavirus type 31. *J Virol*. May;74(9):4174-82
- Chellapan S, Kraus VB, Kroger B, Munger PM, Howley PM, Phelps WC und Nevins JR (1992)** Adenovirus E1A, simian virus 40 tumor antigen and human papillomavirus E7 protein share the capacity to disrupt the interaction between transcription factor E2F and the retinoblastoma gene product. *Proc Natl Acad Sci USA*. 89: 4549 - 53

- Chen JJ, Reid CE, Band V, Androphy EJ (1995)** Interaction of papillomavirus E6 oncoproteins with a putative calcium-binding protein. *Science*. Jul 28;269(5223):529-31
- Cheng G, Cleary AM, Ye ZS, Hong DI, Lederman S, Baltimore D (1995)** Involvement of CRAF1, a relative of TRAF, in CD40 signaling. *Science*. Mar 10;267(5203):1494-8
- Chiao PJ, Shin DM, Sacks PG, Hong WK, Tainsky MA (1992)** Elevated expression of the ribosomal protein S2 gene in human tumors. *Mol Carcinog*. ;5(3):219-31
- Chomczynski P und Sacchi N (1987)** Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. Apr;162(1):156-9
- Chow LT, Reilly SS, Broker TR, Taichman LB (1987)** Identification and mapping of human papillomavirus type 1 RNA transcripts recovered from plantar warts and infected epithelial cell cultures. *J Virol. Jun*. 61(6):1913-8
- Christofori G und Semb H (1999)** The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene. *Trends Biochem Sci*. Feb;24(2):73-6. Review
- Clertant P und Seif I (1984)** A common function for polyoma virus large-T and papillomavirus E1 proteins?. *Nature*. Sep 20-26;311(5983):276-9
- Contrino J, Hair G, Kreutzer DL, Rickles FR (1996)** In situ detection of tissue factor in vascular endothelial cells: correlation with the malignant phenotype of human breast disease. *Nat Med*. Feb;2(2):209-15
- Corral M, Paris B, Baffet G, Tichonicky L, Guguen-Guillouzo C, Kruh J, Defer N (1989)** Increased level of the mitochondrial ND5 transcript in chemically induced rat hepatomas. *Exp Cell Res*. Sep;184(1):158-66
- Cortes U, Moyret-Lalle C, Falette N, Duriez C, Ghissassi FE, Barnas C, Morel AP, Hainaut P, Magaud JP, Puisieux A (2000)** BTG gene expression in the p53-dependent and -independent cellular response to DNA damage. *Mol Carcinog*. Feb;27(2):57-64
- Craven RJ, Xu LH, Weiner TM, Fridell YW, Dent GA, Srivastava S, Varnum B, Liu ET, Cance WG (1995)** Receptor tyrosine kinases expressed in metastatic colon cancer. *Int J Cancer*. Mar 16;60(6):791-7
- Crook T, Wrede D, Vousden K (1991)** p53 point mutations in HPV negative human cervical carcinoma cell lines. *Oncogene*. 6: 873
- Cullen AP, Reid R, Champion M, Lorincz AT (1991)** Analysis of the physical state of different human papillomavirus DNAs in intraepithelial and invasive cervical neoplasm. *J Virol*. Feb;65(2):606-12
- Danno K, Takigawa M, Ikai K, Imamura S, Kitano Y (1983)** Distribution patterns of cytoplasmic microtubules in epidermal keratinocytes. *Br J Dermatol*. Oct;109(4):401-11
- Darai E, Desolle L, Lecuru F, Soriano D (2000)** Transvaginal hydrolaparoscopy compared with laparoscopy for the evaluation of infertile women: a prospective comparative blind study. *Hum Reprod*. Nov;15(11):2379-82

- Davidson B, Nesland JM, Goldberg I, Kopolovic J, Gotlieb WH, Bryne M, Ben-Baruch G, Berner A, Reich R (2001)** Caveolin-1 expression in advanced-stage ovarian carcinoma-a clinicopathologic study. *Gynecol Oncol.* May;81(2):166-71
- Davis TN (1992)** What's new with calcium?. *Cell.* Nov 13;71(4):557-64
- De Iorio P, Midulla C, Pisani T, Valli C, Grillo L, Di Cocco B, Nofroni I, Vecchione A (2001)** Implication of laminin and collagen type IV expression in the progression of breast carcinoma. *Anticancer Res.* Mar-Apr;21(2B):1395-9
- de Jong JS, van Diest PJ, van der Valk P, Baak JP (2001)** Expression of growth factors, growth factor receptors and apoptosis related proteins in invasive breast cancer: relation to apoptotic rate. *Breast Cancer Res Treat.* Apr;66(3):201-8
- de Saizieu A, Certa U, Warrington J, Gray C, Keck W, Mous J (1998)** Bacterial transcript imaging by hybridization of total RNA to oligonucleotide arrays. *Nat Biotechnol.* Jan;16(1):45-8. Review
- de Villiers EM (1994)** Human pathogenic papillomavirus types: an update. *Curr Top Microbiol Immunol.* 186: 1- 12
- de Villiers EM (1997)** Papillomavirus and HPV Typing. *Clin Dermatol.* 15 : 199 – 206
- Deblandre GA, Marinx OP, Evans SS, Majaj S, Leo O, Caput D, Huez GA, Wathelet MG (1995)** Expression cloning of an interferon-inducible 17-kDa membrane protein implicated in the control of cell growth. *J Biol Chem.* Oct 6;270(40):23860-6
- Demarchi F, Verardo R, Varnum B, Brancolini C, Schneider C (2001)** Gas6 anti-apoptotic signaling requires NF-kappa B activation. *J Biol Chem.* Aug 24;276(34):31738-44
- Denk C, Butz K, Schneider A, Dürst M, Hoppe-Seyler F (2001)** p53 mutations are rare events in recurrent cervical cancer. *J Mol Med.* Jun;79(5-6):283-8
- DeRisi JL, Iyer VR, Brown PO (1997)** Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science.* Oct 24;278(5338):680-6
- DeRisi JL, Penland L, Brown PO, Bittner ML, Meltzer PS, Ray M, Chen Y, Su YA, Trent JM (1996)** Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer. *Nat Genet.* Dec;14(4):457-60
- Desaintes C, Hallez S, van Alhen P, Burney A (1992)** Transcriptional activation of several heterologous promoters by the E6 protein of human papillomavirus type 16. *J Virol.* 66 : 325 - 333
- Dey A, Atcha IA, Bagchi S (1997)** HPV16E6 oncoprotein stimulates the transforming growth factor – β 1 promoter in fibroblasts through a specific GC-rich sequence. *Virology* 228: 190 – 9
- Doldi N, Origoni M, Bassan M, Ferrari D, Rossi M, Ferrari A (1996)** Vascular endothelial growth factor. Expression in human vulvar neoplastic and nonneoplastic tissues. *J Reprod Med* Nov;41(11):844-8

- Doorbar J, Evans HS, Coneron I, Crawford LV, Gallimore PH (1988)** Analysis of HPV-1 E4 gene expression using epitope-defined antibodies. *EMBO J.* Mar;7(3):825-33
- Doorbar J, Foo C, Coleman N, Medcalf L, Hartley O, Prospero T, Napthine S, Sterling J, Winter G, Griffin H (1997)** Characterization of events during the late stages of HPV16 infection in vivo using high-affinity synthetic Fabs to E4. *Virology.* Nov 10;238(1):40-52
- Doostzadeh-Cizeron J, Yin S, Goodrich DW (2000)** Apoptosis induced by the nuclear death domain protein p84N5 is associated with caspase-6 and NF-kappa B activation. *J Biol Chem.* Aug 18;275(33):25336-41
- Dowd DR, MacDonald PN, Komm BS, Haussler MR, Miesfeld RL (1992)** Stable expression of the calbindin-D28K complementary DNA interferes with the apoptotic pathway in lymphocytes. *Mol Endocrinol.* Nov;6(11):1843-8
- Duncan EL, Perrem K, Reddel RR (2000)** Identification of a novel human mitochondrial D-loop RNA species which exhibits upregulated expression following cellular immortalization. *Biochem Biophys Res Commun.* Sep 24;276(2):439-46
- Dürst M, Dzarlieva-Petrusevska RT, Boukamp P, Fusenig NE, Gissmann L (1987)** Molecular and cytogenetic analysis of immortalized human primary keratinocytes obtained after transfection with human papillomavirus type 16 DNA. *Oncogene.* 1(3):251-6
- Dürst M, Gissmann L, Ikenberg H, zur Hausen H (1983)** A papillomavirus DNA from a cervical carcinomas and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proc Natl Acad Sci USA.* 80: 3812 – 5
- Dürst M, Glitz D, Schneider A, zur Hausen H (1992)** Human papillomavirus type 16 (HPV16) gene expression and DNA replication in cervical neoplasia: analysis by in situ hybridization. *Virology.* 189: 132 - 40
- Dürst M, Kleinheinz A, Hotz M, Gissmann L (1985)** The physical state of human papillomavirus type 16 DNA in benign and malignant genital tumours. *J Gen Virol.* Jul;66 (Pt 7):1515-22
- Dyson N, Guida P, Münger K, Harlow E (1992)** Homologous sequences in adenovirus E1A and human papillomavirus E7 Protein mediate interaction with the same set of cellular proteins. *J Virol.* 66: 6893 – 902
- Eckert RL, Crish JF, Robinson NA (1997)** The epidermal keratinocyte as a model for the study of gene regulation and cell differentiation. *Physiol Rev.* Apr;77(2):397-424. Review
- Efimova T, LaCelle P, Welter JF, Eckert RL (1998)** Regulation of human involucrin promoter activity by a protein kinase C, Ras, MEKK1, MEK3, p38/RK, AP1 signal transduction pathway. *J Biol Chem.* Sep 18;273(38):24387-95
- El-Bahrawy MA und Pignatelli M (1998)** E-cadherin and catenins: molecules with versatile roles in normal and neoplastic epithelial cell biology. *Microsc Res Tech.* Nov 1;43(3):224-32. Review
- Estus S, Zaks WJ, Freeman RS, Gruda M, Bravo R, Johnson EM Jr. (1994)** Altered gene expression in neurons during programmed cell death: identification of c-jun as necessary for neuronal apoptosis. *J Cell Biol.* Dec;127(6 Pt 1):1717-27

- Etscheid BG, Foster SA, Galloway DA (1994)** The E6 protein of human papillomavirus type 16 functions as a transcriptional repressor in a mechanism independent of the tumor suppressor protein p53. *Virology*. 205 : 583 - 5
- Evans MJ und Scarpulla RC (1989)** Interaction of nuclear factors with multiple sites in the somatic cytochrome c promoter. Characterization of upstream NRF-1, ATF, and intron Sp1 recognition sequences. *J Biol Chem*. Aug 25;264(24):14361-8
- Evans SS, Lee DB, Han T, Tomasi TB, Evans RL (1990)** Monoclonal antibody to the interferon-inducible protein Leu-13 triggers aggregation and inhibits proliferation of leukemic B cells. *Blood*. Dec 15;76(12):2583-93
- Faiella L, Ng C, Hsieh TC, Wu JM, Mallouh C (1996)** Effects of IFN-beta and 1,25-dihydroxyvitamin D3 on cellular proliferation, induction of 2',5'-oligoadenylate (2-5A) synthetase and changes in immunoreactive pRB/p53 in human prostatic JCA-1 cells. *Biochem Mol Biol Int*. Aug;39(6):1085-92
- Feinberg AP und Vogelstein B (1983)** A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem*. Jul 1;132(1):6-13
- Feinberg AP und Vogelstein B (1984)** "A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity". Addendum. *Anal Biochem*. Feb;137(1):266-7
- Ficazzola MA, Fraiman M, Gitlin J, Woo K, Melamed J, Rubin MA, Walden PD (2001)** Antiproliferative B cell translocation gene 2 protein is down-regulated post-transcriptionally as an early event in prostate carcinogenesis. *Carcinogenesis*. Aug;22(8):1271-9
- Fiedler F, Mallo GV, Bodeker H, Keim V, Dagorn JC, Iovanna JL (1998)** Overexpression of the PC3/TIS21/BTG2 mRNA is part of the stress response induced by acute pancreatitis in rats. *Biochem Biophys Res Commun*. Aug 19;249(2):562-5
- Fine SW, Lisanti MP, Galbiati F, Li M (2001)** Elevated expression of caveolin-1 in adenocarcinoma of the colon. *Am J Clin Pathol*. May;115(5):719-24
- Fischer U, Raptis G, Gessner W, Roschlau U, Dressler K, Bilek K, Horn LC (2001)** Epidemiology and pathogenesis of cervical cancer. *Zentralbl Gynakol*. Apr; 123 (4): 198-205
- Fitzgibbon J, Katsanis N, Wells D, Delhanty J, Vallins W, Hunt DM (1996)** Human guanylate kinase (GUK1): cDNA sequence, expression and chromosomal localisation. *FEBS Lett*. May 6;385(3):185-8
- Fleischmajer R, Kuroda K, Utani A, Douglas MacDonald E, Perlish JS, Arikawa-Hirasawa E, Sekiguchi K, Sanzen N, Timpl R, Yamada Y (2000)** Differential expression of laminin alpha chains during proliferative and differentiation stages in a model for skin morphogenesis. *Matrix Biol*. Dec;19(7):637-47
- Foletta VC (1996)** Transcription factor AP-1, and the role of Fra-2. *Immunol Cell Biol*. Apr;74(2):121-33. Review

- Fontaine V, van der Meijden E, de Graaf J, ter Schegget J, Struyk L (2000)** A functional NF-kappaB binding site in the human papillomavirus type 16 long control region. *Virology*. Jun 20;272(1):40-9
- Foster SA, Galloway DA (1996)** Human papillomavirus type 16 E7 alleviates a proliferation block in early passage human mammary epithelial cells. *Oncogene*, Apr 18;12(8):1773-9
- French LE und Tschopp J (2000)** Fas-mediated cell death in toxic epidermal necrolysis and graft-versus-host disease: potential for therapeutic inhibition. *Schweiz Med Wochenschr*. Nov 4;130(44):1656-61. Review
- Friberg H, Ferrand-Drake M, Bengtsson F, Halestrap AP, Wieloch T (1998)** Cyclosporin A, but not FK 506, protects mitochondria and neurons against hypoglycemic damage and implicates the mitochondrial permeability transition in cell death. *J Neurosci*. Jul 15;18(14):5151-9
- Frigerio JM, Dagorn JC, Iovanna JL (1995)** Cloning, sequencing and expression of the L5, L21, L27a, L28, S5, S9, S10 and S29 human ribosomal protein mRNAs. *Biochim Biophys Acta*. May 17;1262(1):64-8
- Frodin M und Gammeltoft S (1999)** Role and regulation of 90 kDa ribosomal S6 kinase (RSK) in signal transduction. *Mol Cell Endocrinol*. May 25;151(1-2):65-77. Review
- Fuchs E (1995)** Keratins and the skin. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 11: 123 – 53
- Fuchs E und Byrne C (1994)** The epidermis: Rising to the surface. *Curr Opin Genet Dev*. 4: 725 – 36
- Gajkowska B, Motyl T, Olszewska-Badarczuk H, Godlewski MM (2001)** Expression of BAX in cell nucleus after experimentally induced apoptosis revealed by immunogold and embedment-free electron microscopy. *Cell Biol Int*. 25(8):725-33
- Gandarillas A, Goldsmith LA, Gschmeissner S, Leigh IM, Watt FM (1999)** Evidence that apoptosis and terminal differentiation of epidermal keratinocytes are distinct processes. *Exp Dermatol*. Feb;8(1):71-9
- Gao Q, Srinivasan S, Boyer SN, Wazer DE, Band V (1999)** The E6 oncoprotein of high-risk papillomaviruses bind to a novel putative GAP protein, E6TP1 and target it for degradation. *Molecular and Cellular Biology*. 19: 733 – 44
- Gao X, Porter AT, Honn KV (1997)** Involvement of the multiple tumor suppressor genes and 12-lipoxygenase in human prostate cancer. Therapeutic implications. *Adv Exp Med Biol*;407:41-53. Review
- Garach-Jehoshua O, Ravid A, Liberman UA, Reichrath J, Glaser T, Koren R (1998)** Upregulation of the calcium-dependent protease, calpain, during keratinocyte differentiation. *Br J Dermatol*. Dec;139(6):950-7
- Garcia-Milian R, Rios MA, Amigo M, Diaz D, Guilar O, Silveira M, Arana MJ, Perea SE (1996)** Modulation of human papillomavirus type 16 mRNA in cervical invasive carcinoma patients by interferon-alpha therapy. *J Interferon Cytokine Res*. Sep;16(9):739-43

- Gartel AL, Serfas MS, Tyner AL (1996)** p21-negative regulator of the cell cycle. *Proc Soc Exp Biol Med.* Nov;213(2):138-49. Review
- Gonen H, Shkedy D, Barnoy S, Kosower NS, Ciechanover A (1997)** On the involvement of calpains in the degradation of the tumor suppressor protein p53. *FEBS Lett.* Apr 7;406 (1-2):17-22
- Gorlich D, Hartmann E, Prehn S, Rapoport TA (1992)** A protein of the endoplasmic reticulum involved early in polypeptide translocation. *Nature.* May 7;357(6373):47-52
- Gotzos V, Vogt P, Celio MR (1996)** The calcium binding protein calretinin is a selective marker for malignant pleural mesotheliomas of the epithelial type. *Pathol Res Pract.* Feb;192(2):137-47
- Grand RJ, Doorbar J, Smith KJ, Coneron I, Gallimore PH (1989)** Phosphorylation of the human papillomavirus type 1 E4 proteins in vivo and in vitro. *Virology.* May;170(1):201-13
- Greeno EW, Bach RR, Moldow CF (1996)** Apoptosis is associated with increased cell surface tissue factor procoagulant activity. *Lab Invest.* Aug;75(2):281-9
- Grief F, Sorooff HS, Albers KM, Taichman LB (1989)** The effect of trifluoperazine, a calmodulin antagonist, on the growth of normal and malignant epidermal keratinocytes in culture. *Eur J Cancer Clin Oncol.* Jan;25(1):19-26
- Grigorian M, Andresen S, Tulchinsky E, Kriaievska M, Carlberg C, Kruse C, Cohn M, Ambartsumian N, Christensen A, Selivanova G, Lukanidin E (2001)** Tumor suppressor p53 protein is a new target for the metastasis-associated Mts1/S100A4 protein: functional consequences of their interaction. *J Biol Chem.* Jun 22;276(25):22699-708
- Guerrieri F, Zanotti F, Capozza G, Colaianni G, Ronchi S, Papa S (1991)** Structural and functional characterization of subunits of the F0 sector of the mitochondrial F0F1-ATP synthase. *Biochim Biophys Acta.* Sep 13;1059(3):348-54
- Halbert CL, Demers GW, Galloway DA (1991)** The E7 gene of human papillomavirus type 16 is sufficient for immortalization of human epithelial cells. *J Virol.* 65: 473 – 8
- Hanakawa Y, Amagai M, Shirakata Y, Sayama K, Hashimoto K (2000)** Different effects of dominant negative mutants of desmocollin and desmoglein on the cell-cell adhesion of keratinocytes. *J Cell Sci.* May;113 (Pt 10):1803-11
- Harada H, Andersen JS, Mann M, Terada N, Korsmeyer SJ (2001)** p70S6 kinase signals cell survival as well as growth, inactivating the pro-apoptotic molecule BAD. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Aug 14;98(17):9666-70
- Harris CE, Boden RA, Astell CR (1999)** A novel heterogeneous nuclear ribonucleoprotein-like protein interacts with NS1 of the minute virus of mice. *J Virol.* Jan;73(1):72-80
- Hawley-Nelson D, Vousden KH, Hubbert NL, Lowy DR, Schiller JT (1989)** HPV16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes. *EMBO J.* 8: 3905 – 10

- Heddi A, Faure-Vigny H, Wallace DC, Stepien G (1996)** Coordinate expression of nuclear and mitochondrial genes involved in energy production in carcinoma and oncocytoma. *Biochim Biophys Acta* Aug 23;1316(3):203-9
- Heerdt, BG, Halsey HK, Lipkin M, Augenlicht LH (1990)** Expression of mitochondrial cytochrome c oxidase in human colonic cell differentiation, transformation, and risk for colonic cancer. *Cancer Res.* Mar 1;50(5):1596-600
- Hegde RS, Voigt S, Rapoport TA, Lingappa VR (1998)** TRAM regulates the exposure of nascent secretory proteins to the cytosol during translocation into the endoplasmic reticulum. *Cell.* Mar 6;92(5):621-31
- Henkler F, Strom M, Mathers K, Cordingley H, Sullivan K, King I (2001)** Transgenic misexpression of the differentiation-specific desmocollin isoform 1 in basal keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 2001 Jan;116(1):144-9
- Hidalgo M und Rowinsky EK (2000)** The rapamycin-sensitive signal transduction pathway as a target for cancer therapy. *Oncogene.* Dec 27;19(56):6680-6. Review
- Higashigawa M, Komada Y, Shimono Y, Nagata T, Inamochi H, Mao XY, M'soka T, Hori H, Kawasaki H, Sakurai M (1997)** FK506 inhibits anti-IgM antibody-induced apoptosis and 17 kD endonuclease activity in the human B-cell line, MBC-1, established from Burkitt's lymphoma. *Br J Haematol.* Dec;99(4):908-13
- Hiscox S und Jiang WG (1999)** Ezrin regulates cell-cell and cell-matrix adhesion, a possible role with E-cadherin/beta-catenin. *J Cell Sci.* 1999 Sep;112 Pt 18:3081-90
- Ho GY, Burk RD, Fleming I, Klein RS (1994)** Risk of genital human papillomavirus infection in women with human immunodeficiency virus-induced immunosuppression. *Int J Cancer.* 56: 788 – 792
- Höckel M, Schlenger K, Höckel S, Vaupel P (1999)** Hypoxic cervical cancers with low apoptotic index are highly aggressive. *Cancer Res.* Sep 15;59(18):4525-8
- Hosoi H, Dilling MB, Shikata T, Liu LN, Shu L, Ashmun RA, Germain GS, Abraham RT, Houghton PJ (1999)** Rapamycin causes poorly reversible inhibition of mTOR and induces p53-independent apoptosis in human rhabdomyosarcoma cells. *Cancer Res.* Feb 15;59(4):886-94
- Hu HM, O'Rourke K, Boguski MS, Dixit VM (1994)** A novel RING finger protein interacts with the cytoplasmic domain of CD40. *J Biol Chem.* Dec 2;269(48):30069-72
- Hudson JB, Bedell MA, McCance DJ, Laiminis LA (1990)** immortalization and altered differentiation of human keratinocytes in vitro by the E6 and E7 open reading frames of human papillomavirustype 18. *J Virol.* 64: 519 -526
- Huibregtse JM, Scheffner M, Howley PM (1991)** A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human papillomavirus types 16 or 18. *EMBO J.* 10: 4129 – 4135
- IARC Monograph (1995)** IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Human Papillomaviruses IARC. Lyon, France: 64

- Ishida-Yamamoto A, Takahashi H, Presland RB, Dale BA, Iizuka H (1998)** Translocation of profilaggrin N-terminal domain into keratinocyte nuclei with fragmented DNA in normal human skin and loricrin keratoderma. *Lab Invest.* Oct. 78(10):1245-53
- Ishida-Yamamoto A, Tanaka H, Nakane H, Takahashi H, Hashimoto Y, Iizuka H (1999)** Programmed cell death in normal epidermis and loricrin keratoderma. Multiple functions of profilaggrin in keratinization. *J Investig Dermatol Symp Proc.* Sep;4(2):145-9. Review
- Javed AA, Ogata K, Sanadi DR (1991)** Human mitochondrial ATP synthase: cloning cDNA for the nuclear-encoded precursor of coupling factor 6. *Gene.* Jan 15;97(2):307-10
- Jeffers MD, Paxton J, Bolger B, Richmond JA, Kennedy JH, McNicol AM (1997)** E-cadherin and integrin cell adhesion molecule expression in invasive and in situ carcinoma of the cervix. *Gynecol Oncol.* Mar;64(3):481-6
- Jeronimo C, Nomoto S, Caballero OL, Usadel H, Henrique R, Varzim G, Oliveira J, Lopes C, Fliss MS, Sidransky D (2001)** Mitochondrial mutations in early stage prostate cancer and bodily fluids. *Oncogene.* Aug 23;20(37):5195-8
- Johnston D, Hall H, DiLorenzo TP, Steinberg BM (1999)** Elevation of the epidermal growth factor receptor and dependent signaling in human papillomavirus-infected laryngeal papillomas. *Cancer Res.* Feb 15;59(4):968-74
- Kakkar AK, Lemoine NR, Scully MF, Tebbutt S, Williamson RC (1995)** Tissue factor expression correlates with histological grade in human pancreatic cancer. *Br J Surg.* Aug;82 (8):1101-4
- Kanda T, Watanabe S, Yoshiike K (1988)** immortalization of primary rat cells by human papillomavirus type 16 subgenomic DNA fragments controlled by the SV40 promoter. *Virology.* Jul;165(1):321-5
- Kanda T, Watanabe S, Zanma S, Sato H, Furuno A und Yoshike K (1991)** Human Papillomavirus type 16E6 protein with glycine substitution for cysteine in the metal – binding motif. *Virology.* 185: 536 – 548
- Kannan K, Amariglio N, Rechavi G, Jakob-Hirsch J, Kela I, Kaminski N, Getz G, Domany E, Givol D (2001)** DNA microarrays identification of primary and secondary target genes regulated by p53. *Oncogene.* Apr 26;20(18):2225-34
- Kataja V, Syrjänen K, Mäntyjärvi R, Väyrynen M, Syrjänen S, Saarikoski S, Parkkinen S, Yliskoski M, Salonen JT, Castren O (1989)** Prospective follow-up of cervical HPV Infections: life table analysis of histopathological, cytological and colposcopic data. *Eur J Epidemiol.* 5: 1 – 7
- Kato M, Nonaka T, Maki M, Kikuchi H, Imajoh-Ohmi S (2000)** Caspases cleave the amino-terminal calpain inhibitory unit of calpastatin during apoptosis in human Jurkat T cells. *J Biochem.* Feb;127(2):297-305
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR (1972)** Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* Aug;26(4):239-57. Review
- Khanna N, Reddy VG, Tuteja N, Singh N (2000)** Differential gene expression in apoptosis: identification of ribosomal protein S29 as an apoptotic inducer. *Biochem Biophys Res Commun.* Oct 22;277(2):476-86

- Kim CY, Tsai MH, Osmanian C, Graeber TG, Lee JE, Giffard RG, DiPaolo JA, Peehl DM, Giaccia AJ (1997)** Selection of human cervical epithelial cells that possess reduced apoptotic potential to low-oxygen conditions. *Cancer Res.* Oct 1;57(19):4200-4
- Kim H, Scorilas A, Katsaros D, Yousef GM, Massobrio M, Fracchioli S, Piccinno R, Gordini G, Diamandis EP (2001)** Human kallikrein gene 5 (KLK5) expression is an indicator of poor prognosis in ovarian cancer. *Br J Cancer.* Mar 2;84(5):643-50
- Kimura K, Endo Y, Yonemura Y, Heizmann CW, Schafer BW, Watanabe Y, Sasaki T (2000)** Clinical significance of S100A4 and E-cadherin-related adhesion molecules in non-small cell lung cancer. *Int J Oncol.* Jun;16(6):1125-31
- Kinoshita T, Shirasawa H, Shino Y, Moriya H, Desbarats L, Eilers M, Simizu B (1997)** Transactivation of prothymosin alpha and c-myc promoters by human papillomavirus type 16 E6 protein. *Virology.* May 26;232(1):53-61
- Klingenberg M (1975)** Energetic aspects of transport of ADP and ATP through the mitochondrial membrane. *Ciba Found Symp.* (31):105-24
- Klus GT, Rokaeus N, Bittner ML, Chen Y, Korz DM, Sukumar S, Schick A, Szallasi Z (2001)** Down-regulation of the desmosomal cadherin desmocollin 3 in human breast cancer. *Int J Oncol.* Jul;19(1):169-74
- Koide N, Nishio A, Hiraguri M, Hanazaki K, Adachi W, Amano J (2001)** Coexpression of vascular endothelial growth factor and p53 protein in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Am J Gastroenterol.* Jun;96(6):1733-40
- Kumar P, Mark PJ, Ward BK, Minchin RF, Ratajczak T (2001)** Estradiol-regulated expression of the immunophilins cyclophilin 40 and FKBP52 in MCF-7 breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* Jun 1;284(1):219-25
- Kuroda S, Fukata M, Nakagawa M, Fujii K, Nakamura T, Ookubo T, Izawa I, Nagase T, Nomura N, Tani H, Shoji I, Matsuura Y, Yonehara S, Kaibuchi K (1998)** Role of IQGAP1, a target of the small GTPases Cdc42 and Rac1, in regulation of E-cadherin-mediated cell-cell adhesion. *Science.* Aug 7;281(5378):832-5
- Kyo S, Klumpp DJ, Inoue M, Kanaya T, Laimins LA (1997)** Expression of AP1 during cellular differentiation determines human papillomavirus E6/E7 expression in stratified epithelial cells. *J Gen Virol.* Feb;78 (Pt 2):401-11
- Land H, Parada LF, Weinberg RA (1993)** Cellular Onkogeneses and multistep carcinogenesis. *Science.* 1983 222: 771 - 778
- Lane D (1992)** P53-guardian of the genome. *Nature.* 358: 15 – 16
- Laporte M, Galand P, Fokan D, de Graef C, Heenen M (2000)** Apoptosis in established and healing psoriasis. *Dermatology.* 200(4):314-6
- Lechner MS, Mack DH, Finicle T, Crook KH, Vousden KH, Laimins LA (1992)** Human Papillomavirus E6 proteins bind p53 in vivo and abrogate p53 mediated repression of transactivation. *EMBO J.* 11: 3045 – 30 52

- Lecomte F, Champagne B, Dasnoy JF, Szpirer J, Szpirer C (1995)** The mammalian RPS6 gene, homolog of the *Drosophila* air8 tumor suppressor gene: is it an oncosuppressor gene?. *Somat Cell Mol Genet.* Nov;21(6):443-50
- Lee SB und Esteban M (1994)** The interferon-induced double-stranded RNA-activated protein kinase induces apoptosis. *Virology.* Mar;199(2):491-6
- Lee WP, Liao Y, Robinson D, Kung HJ, Liu ET, Hung MC (1999)** Axl-gas6 interaction counteracts E1A-mediated cell growth suppression and proapoptotic activity. *Mol Cell Biol.* Dec;19(12):8075-82
- Lehn H, Krieg P, Sauer G (1985)** Papillomavirus genomes in human cervical tumors: analysis of their transcriptional activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Aug;82(16):5540-4
- Lehn H, Villa LL, Marziona F, Hilgarth M, Hillemans HG, Sauer G (1988)** Physical state and biological activity of human papillomavirus genomes in precancerous lesions of the female genital tract. *J Gen Virol.* Jan;69 (Pt 1):187-96
- Leo E, Deveraux QL, Buchholtz C, Welsh K, Matsuzawa S, Stennicke HR, Salvesen GS, Reed JC (2001)** TRAF1 is a substrate of caspases activated during tumor necrosis factorreceptor-alpha-induced apoptosis. *J Biol Chem.* Mar 16;276(11):8087-93
- Leopold P, Mougneau E, Vailly J, Cerni C, Rassoulzadegan M, Cuzin F (1967)** Biochemical adaptations in muscle. Effects of exercise on mitochondrial oxygen uptake and respiratory enzyme activity in skeletal muscle. *J Biol Chem.* May 10;242(9):2278-82
- Li JJ, Cao Y, Young MR, Colburn NH (2000)** Induced expression of dominant-negative c-jun downregulates NFkappaB and AP-1 target genes and suppresses tumor phenotype in human keratinocytes. *Mol Carcinog.* Nov;29(3):159-69
- Li Z, Kim SH, Higgins JM, Brenner MB, Sacks DB (1999)** IQGAP1 and calmodulin modulate E-cadherin function. *J Biol Chem.* Dec 31;274(53):37885-92
- Li JJ, Rhim JS, Schlegel R, Vousden KH, Colburn NH (1998)** Expression of dominant negative Jun inhibits elevated AP-1 and NF-kappaB transactivation and suppresses anchorage independent growth of HPV immortalized human keratinocytes. *Oncogene.* May 28;16(21):2711-21
- Liang P, Bauer D, Averboukh L, Warthoe P, Rohrwild M, Muller H, Strauss M, Pardee AB (1995)** Analysis of altered gene expression by differential display. *Methods Enzymol.* 254:304-21
- Liang P und Pardee AB (1992)** Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science.* Aug 14;257(5072):967-71
- Liang P und Pardee AB (1995)** Recent advances in differential display. *Curr Opin Immunol.* Apr;7(2):274-80. Review
- Lie AK, Skarsvag S, Skomedal H, Haugen OA, Holm R (1999)** Expression of p53, MDM2, and p21 proteins in high-grade cervical intraepithelial neoplasia and relationship to human papillomavirus infection. *Int J Gynecol Pathol.* Jan;18(1):5-11

- Lim PS, Jenson AB, Cowsert L, Nakai Y, Lim LY, Jin XW, Sundberg JP (1990)** Distribution and specific identification of papillomavirus major capsid protein epitopes by immunohistochemistry and epitope scanning of sythetic peptides. *J Infect Dis.* 162: 1263 - 1269
- Lind DS, Hochwald SN, Malaty J, Rekkas S, Hebig P, Mishra G, Moldawer LL, Copeland EM 3rd, Mackay S (2001)** Nuclear factor-kappa B is upregulated in colorectal cancer. *Surgery.* Aug;130(2):363-9
- Linderholm BK, Lindahl T, Holmberg L, Klaar S, Lennerstrand J, Henriksson R, Bergh J (2001)** The expression of vascular endothelial growth factor correlates with mutant p53 and poor prognosis in human breast cancer. *Cancer Res.* Mar 1;61(5):2256-60
- Ling L und Goeddel DV (2000)** MIP-T3, a novel protein linking tumor necrosis factor receptor-associated factor 3 to the microtubule network. *J Biol Chem.* Aug 4;275(31):23852-60
- Liu J, Lee P, Galbiati F, Kitsis RN, Lisanti MP (2001)** Caveolin-1 expression sensitizes fibroblastic and epithelial cells to apoptotic stimulation. *Am J Physiol Cell Physiol.* Apr;280(4):C823-35
- Lopez-Ocejo O, Vilorio-Petit A, Bequet-Romero M, Mukhopadhyay D, Rak J, Kerbel RS (2000)** Oncogenes and tumor angiogenesis: the HPV-16 E6 oncoprotein activates the vascular endothelial growth factor (VEGF) gene promoter in a p53 independent manner. *Oncogene.* Sep 21;19(40):4611-20
- Lorincz AT, Reid R, Jenson AB, Greenberg MD Lancaster W, Kurman RJ (1992)** Human Papillomavirus infection of the cervix: relative risk associations of 15 common anogenital types. *Obstet Gynecol.* 79: 328-337
- Luo LY, Katsaros D, Scorilas A, Fracchioli S, Piccinno R, Rigault De La Longrais IA, Howarth DJ, Diamandis EP (2001)** Prognostic value of human kallikrein 10 expression in epithelial ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res.* Aug;7(8):2372-9
- Luo LY, Rajpert-De Meyts ER, Jung K, Diamandis EP (2001)** Expression of the normal epithelial cell-specific 1 (NES1; KLK10) candidate tumour suppressor gene in normal and malignant testicular tissue. *Br J Cancer.* Jul 20;85(2):220-4
- Lusky M und Fontane E (1991)** Formation of the complex of bovine papillomavirus E1 and E2 proteins is modulated by E2 phosphorylation and depends upon sequences within the carboxyl terminus of E1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 Jul 15;88(14):6363-7
- Lwaleed BA, Francis JL, Chisholm M (2000)** Urinary tissue factor levels in patients with bladder and prostate cancer. *Eur J Surg Oncol.* Feb;26(1):44-9
- Ma S, Rao L, Freedberg IM, Blumenberg M (1997)** Transcriptional control of K5, K6, K14, and K17 keratin genes by AP-1 and NF-kappaB family members. *Gene Expr.* 6(6):361-70
- Maas-Szabowski N, Szabowski A, Stark HJ, Andrecht S, Kolbus A, Schorpp-Kistner M, Angel P, Fusenig NE (2001)** Organotypic cocultures with genetically modified mouse fibroblasts as a tool to dissect molecular mechanisms regulating keratinocyte growth and differentiation. *J Invest Dermatol.* May;116(5):816-20

- Maeldandsmo GM, Florenes VA, Mellingsaeter T, Hovig E, Kerbel RS, Fodstad O (1997)** Differential expression patterns of S100A2, S100A4 and S100A6 during progression of human malignant melanoma. *Int J Cancer*. Aug 22;74(4):464-9
- Mahajan PB (1994)** Modulation of transcription of rRNA genes by rapamycin. *Int J Immunopharmacol*. Sep;16(9):711-21
- Mallon RG, Wojciechowicz D, Defendi V (1987)** DNA-binding activity of papillomavirus proteins. *J Virol*. 5: 1655-1660
- Marechal V, Elenbaas B, Piette J, Nicolas JC, Levine AJ (1994)** The ribosomal L5 protein is associated with mdm-2 and mdm-2-p53 complexes. *Mol Cell Biol*. Nov;14(11):7414-20
- Martinetti A, Seregini E, Belli F, Mazzocchi A, Agresti R, Cascinelli N, Greco M, Bombardieri E (1998)** Evaluation on serum 2'-5'oligoadenylate synthetase (2'-5'oligoAS) and beta 2 microglobulin (B2M) in patients with nodal metastases from cutaneous malignant melanoma treated with rIFN-alpha 2A. *Anticancer Res*. May-Jun;18(3B):2027-30
- Matlashewski G, Osborn K, Banks L, Stanley M, Crawford L (1988)** Transformation of primary human fibroblast cells with human papillomavirus type 16 DNA and EJ-ras. *Int J Cancer*. 42: 232 – 238
- Matlashewski G, Schneider J, Banks L, Jones N, Murray A Crawford L (1987)** Human Papillomavirus type 16 DNA cooperates with activated rats transforming primary cells. *EMBO J*. 6: 1741 – 17 46
- Matsunaga T, Kudo J, Takahashi K, Dohmen K, Hayashida K, Okamura S, Ishibashi H, Niho Y (1996)** Rotenone, a mitochondrial NADH dehydrogenase inhibitor, induces cell surface expression of CD13 and CD38 and apoptosis in HL-60 cells. *Leuk Lymphoma*. Feb;20(5-6):487-94
- Mattson MP, Cheng B, Baldwin SA, Smith-Swintosky VL, Keller J, Geddes JW, Christakos S (1995)** Brain injury and tumor necrosis factors induce calbindin D-28k in astrocytes: evidence for a cytoprotective response. *J Neurosci Res*. Oct 15;42(3):357-70
- McBride AA, Romanczuk H, Howley PM (1991)** The papillomavirus E2 regulatory proteins. *J Biol Chem*. 266, 18411-18414
- McCance DJ, Kopan R, Fuchs E, Laimins LA (1988)** Human Papillomavirus type 16 alters human epithelial cell differentiation in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 85 : 7169 – 7173
- Melcher A, Gough M, Todryk S, Vile R (1999)** Apoptosis or necrosis for tumor immunotherapy: what's in a name?. *J Mol Med*. 77:824-833
- Meleti Z, Shapiro IM, Adams CS (2000)** Inorganic phosphate induces apoptosis of osteoblast-like cells in culture. *Bone*. Sep;27(3):359-66
- Menon AG, Rutter JL, von Sattel JP, Synder C, Murdoch A, Blumenfeld RL, Martuza A, Deimling JF, Gusella JF, Houseal TW (1997)** Frequent loss of chromosome 14 in atypical and malignant meningioma: identification of a putative „tumor progression“ locus. *Oncogene*. 14: 611 - 616

- Mialhe A, Lafanechere L, Treilleux I, Peloux N, Dumontet C, Bremond A, Panh MH, Payan R, Wehland J, Margolis RL, Job D (2001)** Tubulin deetyrosination is a frequent occurrence in breast cancers of poor prognosis. *Cancer Res.* Jul 1;61(13):5024-7
- Milde-Langosch K, Bamberger AM, Goemann C, Rossing E, Rieck G, Kelp B, Loning T (2000)** Expression of cell-cycle regulatory proteins in endometrial carcinomas: correlations with hormone receptor status and clinicopathologic parameters. *J Cancer Res Clin Oncol.* Sep;127(9):537-44
- Milde-Langosch K, Riethdorf S, Won Park T (1999)** Natürlicher Verlauf der HPV-Infektion. *Pathologe.* 20: 15 – 24
- Modrow und Falke (1997)** Molekulare Virologie. Eine Einführung für Biologen und Mediziner. Spektrum Akad. Vlg.
- Montevani F und Banks L (1999)** The Interaction between p53 and papillomaviruses. *Semin Cancer Biol.* 9: 387 – 395
- Moro A, Calixto A, Suarez E, Arana MJ, Perea SE (1998)** Differential expression of the p27Kip1 mRNA in IFN-sensitive and resistant cell lines. *Biochem Biophys Res Commun.* Apr 28;245(3):752-6
- Mosialos G (1997)** The role of Rel/NF-kappa B proteins in viral oncogenesis and the regulation of viral transcription. *Semin Cancer Biol.* Apr;8(2):121-9. Review
- Mosialos G, Birkenbach M, Yalamanchili R, VanArsdale T, Ware C, Kieff E (1995)** The Epstein-Barr virus transforming protein LMP1 engages signaling proteins for the tumor necrosis factor receptor family. *Cell.* Feb 10;80(3):389-99
- Münger K, Phelps WC, Bubbs V, Howley PM, Schlegel R (1989)** The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. *J Virol.* 63: 4417 – 4421
- Nair P, Nair KM, Jayaprakash PG, Pillai MR (1999)** Decreased programmed cell death in the uterine cervix associated with high risk human papillomavirus infection. *Pathol Oncol Res.* 5(2):95-103
- Nasiell K, Nasiell M, Vaclavinkov V (1983)** Behavior of moderate cervical dysplasia during long-term follow up. *Obstet Gynecol.* 61 609 – 614
- Nees (1997)** Nachweis differenziell exprimierter Gene in einem Zellkultur-Modellsystem für die HPV-bedingte Tumorentstehung. Dissertation an der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
- Nees M, Geoghegan JM, Hyman T, Frank S, Miller L, Woodworth CD (2001)** Papillomavirus type 16 oncogenes downregulate expression of interferon-responsive genes and upregulate proliferation-associated and NF-kappaB-responsive genes in cervical keratinocytes. *J Virol.* May;75(9):4283-96
- Nees M, Geoghegan JM, Munson P, Prabhu V, Liu Y, Androphy E, Woodworth CD (2000)** Human papillomavirus type 16 E6 and E7 proteins inhibit differentiation-dependent expression of transforming growth factor-beta2 in cervical keratinocytes. *Cancer Res.* Aug 1;60(15):4289-98

- Nees M, van Wijngaarden E, Bakos E, Schneider A, Dürst M (1998)** Identification of novel molecular markers which correlate with HPV-induced tumor progression. *Oncogene*. May 14;16(19):2447-58
- Nevins JR (1992)** E2F: a link between the Rb tumor suppressor protein and viral oncoproteins. *Science*. 258: 424 - 429
- Niki I, Yokokura H, Sudo T, Kato M, Hidaka H (1996)** Ca²⁺ signaling and intracellular Ca²⁺ binding proteins. *J Biochem*. Oct;120(4):685-98
- Nishio H, Matsui K, Tsuji H, Tamura A, Suzuki K (2000)** Immunolocalization of calcineurin and FKBP12, the FK506-binding protein, in Hassall's corpuscles of human thymus and epidermis. *Histochem Cell Biol*. Jul;114(1):9-14
- O'Bryan JP, Fridell YW, Koski R, Varnum B, Liu ET (1995)** The transforming receptor tyrosine kinase, Axl, is post-translationally regulated by proteolytic cleavage. *J Biol Chem*. Jan 13;270(2):551-7
- Ohshima K, Sugihara M, Haraoka S, Suzumiya J, Kanda M, Kawasaki C, Shimazaki K, Kikuchi M (2001)** Possible immortalization of Hodgkin and Reed-Sternberg cells: telomerase expression, lengthening of telomere, and inhibition of apoptosis by NF-kappaB expression. *Leuk Lymphoma*. Apr;41(3-4):367-76
- Ostrow RS, Liu Z, Schneider JF, McGlennen RC, Forslund K, Fars AJ (1993)** The Products of the E5,E6 or E7 open reading frames of RhPV1 can individually transform NIH 3T3 cells or in cotransfection with activated ras can transform primary rodent epithelial cells. *Virology*. 196: 861 – 867
- Owens DW, Brunton VG, Parkinson EK, Frame MC (2000)** E-cadherin at the cell periphery is a determinant of keratinocyte differentiation in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*. Mar 16;269(2):369-76
- Paramio JM, Segrelles C, Ruiz S, Martin-Caballero J, Page A, Martinez J, Serrano M, Jorcano JL (2001)** The Ink4a/ARF tumor suppressors cooperate with p21CIP1/WAF in the processes of mouse epidermal differentiation, senescence and carcinogenesis. *J Biol Chem*. Sep 10
- Pariat M, Carillo S, Molinari M, Salvat C, Debussche L, Bracco L, Milner J, Piechaczyk M (1997)** Proteolysis by calpains: a possible contribution to degradation of p53. *Mol Cell Biol*. May;17(5):2806-15
- Patel D, Huang SM, Baglia LA, McCance DJ (1999)** The E6 protein of human papillomavirus type 16 binds to and inhibits co-activation by CBP and p300. *EMBO J*. Sep 15;18(18):5061-72
- Peng Y, Du K, Ramirez S, Diamond RH, Taub R (1999)** Mitogenic up-regulation of the PRL-1 protein-tyrosine phosphatase gene by Egr-1. Egr-1 activation is an early event in liver regeneration. *J Biol Chem*. Feb 19;274(8):4513-20
- Pereira-da-Silva L, Sherman M, Lundin M, Baltscheffsky H (1993)** Inorganic pyrophosphate gives a membrane potential in yeast mitochondria, as measured with the permeant cation tetraphenylphosphonium. *Arch Biochem Biophys*. Aug 1;304(2):310-3

- Piao Zf, Ui-Tei K, Nagano M, Miyata Y (2001)** Participation of Intracellular Ca(2+)/Calmodulin and Protein Kinase(s) in the Pathway of Apoptosis Induced by a Drosophila Cell Death Gene, reaper. *Mol Cell Biol Res Commun.* Sep;4(5):307-12
- Pinheiro NA und Villa LL (2001)** Low frequency of p53 mutations in cervical carcinomas among Brazilian women. *Braz J Med Biol Res.* Jun;34(6):727-33
- Pirisi L, Yasumoto S, Feller M, Doniger J, DiPaolo JA (1987)** Transformation of human fibroblast and Keratinocytes with human papillomavirus type 16 DNA. *J Virol.* 61: 1061 – 1066)
- Pirisi L, Batova A, Jenkins GR, Hodam JR, Creek KE (1992)** increased sensitivity of human keratinocytes immortalized by human papillomavirus type 16 DNA to growth control by retinoids. *Cancer Res.* 52: 187 – 193
- Piu F, Aronheim A, Katz S, Karin M (2001)** AP-1 repressor protein JDP-2: inhibition of UV-mediated apoptosis through p53 down-regulation. *Mol Cell Biol.* May;21(9):3012-24
- Pogue-Geile K, Geiser JR, Shu M, Miller C, Wool IG, Meisler AI, Pipas JM (1991)** Ribosomal protein genes are overexpressed in colorectal cancer: isolation of a cDNA clone encoding the human S3 ribosomal protein. *Mol Cell Biol.* Aug;11(8):3842-9
- Puisieux A und Magaud JP (1999)** Mechanisms of BTG2 activity, a transcriptional target of p53: evidences and hypothesis. *Bull Cancer.* Apr;86(4):358-64. Review
- Ray SD, Balasubramanian G, Bagchi D, Reddy CS (2001)** Ca(2+)-calmodulin antagonist chlorpromazine and poly(ADP-ribose) polymerase modulators 4-aminobenzamide and nicotinamide influence hepatic expression of BCL-XL and P53 and protect against acetaminophen-induced programmed and unprogrammed cell death in mice. *Free Radic Biol Med.* Aug 1;31(3):277-91
- Razani B, Altschuler Y, Zhu L, Pestell RG, Mostov KE, Lisanti MP (2000)** Caveolin-1 expression is down-regulated in cells transformed by the human papilloma virus in a p53-dependent manner. Replacement of caveolin-1 expression suppresses HPV-mediated cell transformation. *Biochemistry.* Nov 14;39(45):13916-24
- Razani B, Schlegel A, Liu J, Lisanti MP (2001)** Caveolin-1, a putative tumour suppressor gene. *Biochem Soc Trans.* Aug;29(4):494-9
- Regula KM und Kirshenbaum LA (2000)** p53 activates the mitochondrial death pathway and apoptosis of ventricular myocytes independent of de novo gene transcription. *J Mol Cell Cardiol.* Aug;33(8):1435-45
- Ridley AJ (1997)** The GTP-binding protein Rho. *Int J Biochem Cell Biol.* Nov;29(11):1225-9. Review
- Rochlitz C, Lohri A, Bacchi M, Schmidt M, Nagel S, Fopp M, Fey MF, Herrmann R, Neubauer A (1999)** Axl expression is associated with adverse prognosis and with expression of Bcl-2 and CD34 in de novo acute myeloid leukemia (AML): results from a multicenter trial of the Swiss Group for Clinical Cancer Research (SAKK). *Leukemia.* Sep;13(9):1352-8

- Rodriguez MI, Finbow ME, Alonso A (2000)** Binding of human papillomavirus 16 E5 to the 16 kDa subunit c (proteolipid) of the vascular H⁺-ATPase can be dissociated from the E5-mediated epidermal growth factor receptor overactivation. *Oncogene*. 19 (33): 3727 - 32
- Rogel-Gaillard C, Breitburd F, Orth G (1992)** Human papillomavirus type 1 E4 proteins differing by their N-terminal ends have distinct cellular localizations when transiently expressed in vitro. *J Virol*. Feb;66(2):816-23
- Romanczuk H, Thierry F, Howley PM (1990)** Mutational analysis of cis elements involved in E2 modulation of human papillomavirus type 16 P97 and type 18 P105 promoters. *J Virol*. Jun;64(6):2849-59
- Ronco LV, Karpova AY, Vidal M, Howley PM (1998)** Human papillomavirus 16 E6 oncoprotein binds to interferon regulatory factor-3 and inhibits its transcriptional activity. *Genes Dev*. Jul 1;12(13):2061-72
- Rorke EA, Zhang D, Choo CK, Eckert RL, Jacobberger JW (2000)** TGF-beta-mediated cell cycle arrest of HPV16-immortalized human ectocervical cells correlates with decreased E6/E7 mRNA and increased p53 and p21(WAF-1) expression. *Exp Cell Res*. Aug 25;259(1):149-57
- Rosenthal DS, Simbulan-Rosenthal CM, Iyer S, Smith WJ, Ray R, Smulson ME (2000)** Calmodulin, poly(ADP-ribose)polymerase and p53 are targets for modulating the effects of sulfur mustard. *J Appl Toxicol*. Dec;20 Suppl 1:S43-9
- Rosl F, Das BC, Lengert M, Geletneky K, zur Hausen H (1997)** Antioxidant-induced changes of the AP-1 transcription complex are paralleled by a selective suppression of human papillomavirus transcription. *J Virol*. Jan;71(1):362-70
- Roth KA (2001)** Caspases, apoptosis, and Alzheimer disease: causation, correlation, and confusion. *J Neuropathol Exp Neurol*. Sep;60(9):829-38. Review
- Rothe M, Wong SC, Henzel WJ, Goeddel DV (1994)** A novel family of putative signal transducers associated with the cytoplasmic domain of the 75 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell*. Aug 26;78(4):681-92
- Rouault JP, Prevot D, Berthet C, Birot AM, Billaud M, Magaud JP, Corbo L (1998)** Interaction of BTG1 and p53-regulated BTG2 gene products with mCaf1, the murine homolog of a component of the yeast CCR4 transcriptional regulatory complex. *J Biol Chem*. Aug 28;273(35):22563-9
- Rudland PS, Platt-Higgins A, Renshaw C, West CR, Winstanley JH, Robertson L, Barraclough R (2000)** Prognostic significance of the metastasis-inducing protein S100A4 (p9Ka) in human breast cancer. *Cancer Res*. Mar 15;60(6):1595-603
- Ruf W und Edgington TS (1994)** Structural biology of tissue factor, the initiator of thrombogenesis in vivo. *FASEB J*. Apr 1;8(6):385-90. Review
- Ruf W und Mueller BM (1996)** Tissue factor in cancer angiogenesis and metastasis. *Curr Opin Hematol*. Sep;3(5):379-84. Review

- Rusconi S, Agarossi A, Ravasi L, Tonta A, Conti M, Galli M (1994)** Serum 2'-5'-oligoadenylate synthetase levels and clinical response to interferon-beta therapy in women with genital human papillomavirus infection. *J Infect Dis.* May;169(5):1112-5
- Sack GH Jr, Levin J, Bell WR (1977)** Trousseau's syndrome and other manifestations of chronic disseminated coagulopathy in patients with neoplasms: clinical, pathophysiologic, and therapeutic features. *Medicine (Baltimore).* Jan;56(1):1-37
- Saile B, Matthes N, El Armouche H, Neubauer K, Ramadori G (2001)** The bcl, NFkappaB and p53/p21WAF1 systems are involved in spontaneous apoptosis and in the anti-apoptotic effect of TGF-beta or TNF-alpha on activated hepatic stellate cells. *Eur J Cell Biol.* Aug;80(8):554-61
- Santini MP, Talora C, Seki T, Bolgan L, Dotto GP (2001)** Cross talk among calcineurin, Sp1/Sp3, and NFAT in control of p21(WAF1/CIP1) expression in keratinocyte differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Aug 14;98(17):9575-80
- Susin SA, Zamzami N, Kroemer G(1998)** Mitochondria as regulators of apoptosis: doubt no more. *Biochim Biophys Acta.* Aug 10;1366(1-2):151-65. Review
- Sato T, Iriie S, Reed JC (1995)** A novel member of the TRAF family of putative signal transducing proteins binds to the cytosolic domain of CD40. *FEBS Lett.* Jan 23;358(2):113-8
- Scheffner M, Huibregste JM, Vierstra RD, Howley PM (1993)** The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell.* 75, 495 – 505
- Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ, Howley PM (1990)** The E6 oncoprotein encoded by the human papillomavirustypes 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell.* 63 1129 - 36
- Schlegel A, Volonte D, Engelman JA, Galbiati F, Mehta P, Zhang XL, Scherer PE, Lisanti MP (1998)** Crowded little caves: structure and function of caveolae. *Cell Signal.* Jul;10(7):457-63. Review
- Schlegel R, Phelps WC, Zhang YL, Barbosa M (1988)** Quantitative keratinocyte assay detects two biological activities of human papillomavirus and identifies viral types associated with cervical carcinoma. *EMBO J.* 7: 3181 – 7
- Schneider A, Dürst M, Jochmus I, Gissmann L (1999)** Epidemiologie, Ätiologie und Prävention des Zervixkarzinoms. *Der Gynäkologe.* 32: 247 – 60
- Schneider-Gädicke A und Schwarz E (1986)** Different human cervical carcinoma cell lines show similar transcription patterns of human papillomavirus type 18 early genes. *EMBO J.* Sep;5(9):2285-92
- Seagon S und Dürst M (1994)** Genetic analysis of an in vitro model system for human papillomavirus type 16-associated tumorigenesis. *Cancer Res.* Nov 1;54(21):5593-8
- Seo YS, Muller F, Lusk M und Hurwitz J (1993)** Bovine papillomavirus (BPV)-encoded E1Protein contains multiple activities required for BPV DNA Replication. *Proc Natl Acad Sci USA.* 90: 702 – 6

- Shah SA, Potter MW, Ricciardi R, Perugini RA, Callery MP (2001)** FRAP-p70s6K signaling is required for pancreatic cancer cell proliferation. *J Surg Res.* May 15;97(2):123-30
- Sharp MG, Adams SM, Walker RA, Brammar WJ, Varley JM (1992)** Differential expression of the mitochondrial gene cytochrome oxidase II in benign and malignant breast tissue. *J Pathol.* Oct;168(2):163-8
- Shatton JB, Williams A, Weinhouse S (1983)** Subcellular distribution of inorganic pyrophosphatase activity in various normal and neoplastic cell types. *Cancer Res.* Aug;43(8):3742-7
- Sherbet GV und Lakshmi MS (1998)** S100A4 (MTS1) calcium binding protein in cancer growth, invasion and metastasis. *Anticancer Res.* Jul-Aug;18(4A):2415-21. Review
- Sherman L, Alloul N, Golan I, Dürst M, Baram A (1992)** Expression and Splicing Patterns of human Papillomavirus Type 16 mRNAs in Pre-cancerous Lesions and Carcinomas of the Cervix, in human Keratinocytes immortalized by HPV16 and Cell Lines Established from Cervical Cancers. *Int J Cancer.* 50: 356 - 64
- Sherman L und Schlegel R (1996)** Serum – and calcium-induced Differentiation of human Keratinocytes is inhibited by the E6 oncoprotein of human Papillomavirus Type 16. *J Virol.* 70: 3269 - 79
- Shin SJ, Lee WK, Lim HW, Park J (2000)** Characterization of the ATP transporter in the reconstituted rough endoplasmic reticulum proteoliposomes. *Biochim Biophys Acta.* Sep 29;1468(1-2):55-62
- Shino Y, Shirasawa H, Kinoshita T, Simizu B (1997)** Human papillomavirus type 16 E6 Protein transcriptionally modulates fibronectin gene expression by induction of protein complexes binding to the cyclic AMP response element. *J Virol.* 71 : 4310 – 8
- Shirasawa H, Jin M, Shimizu K, Akutsu N, Shino Y, Simizu B (1994)** Transcription-modulatory activity of full-length E6 and E6*I proteins of human Papillomavirus type 16. *Virology.* 203 : 36 – 42
- Shirasawa H, Tomita Y, Kubota K, Kasai T, Sekiya S, Takamizawa H, Simizu B (1988)** Transcriptional differences of the human papillomavirus type 16 genome between precancerous lesions and invasive carcinomas. *J Virol.* Mar;62(3):1022-7
- Simon M, von Deimling A, Larson JJ, Wellenreuther R, Kaskel P, Waha A, Warnick RE Twe Jr. JM, Menon AG (1995)** Allelic losses on chromosome 14, 10, and 1 in atypical and malignant meningiomas: a genetic model of meningioma progression. *Cancer Research.* 55: 4696 – 701
- Smotkin D, Prokoph H, Wettstein FO (1989)** Oncogenic and nononcogenic human genital papillomaviruses generate the E7 mRNA by different mechanisms. *J Virol.* Mar;63(3):1441-7
- Smotkin D und Wettstein FO (1986)** Transcription of human Papillomavirus Type 16 early genes in a cervical cancer and cancer derived cell line and identification of the E7 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 83: 4680 – 4

- Sohm F, Gaiddon C, Antoine M, Boutillier AL, Loeffler JP (1999)** The retinoblastoma susceptibility gene product/Sp1 signalling pathway is modulated by Ca²⁺/calmodulin kinases II and IV activity. *Oncogene*. Apr 29;18(17):2762-9
- Soto U, Das BC, Lengert M, Finzer P, zur Hausen H, Rosl F (1999)** Conversion of HPV 18 positive non-tumorigenic HeLa-fibroblast hybrids to invasive growth involves loss of TNF-alpha mediated repression of viral transcription and modification of the AP-1 transcription complex. *Oncogene*. May 27;18(21):3187-98
- Stacey SN, Jordan D, Williamson AJ, Brown M, Coote JH, Arrand JR (2000)** Leaky scanning is the predominant mechanism for translation of human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein from E6/E7 bicistronic mRNA. *J Virol*. Aug;74(16):7284-97
- Stegner HE (1997)** HPV-assozierte Dysplasien und Neoplasien des unteren Genitaltraktes, Diagnostische und Therapeutische Aspekte, Infektionen mit Humanen Papillomaviren, HRSG. Spitzner und Metzner 1. Auflage. Medifact Verlags KG.: 61- 71
- Stoler MH (2000)** Human Papillomaviruses and Cervical Neoplasia: A Model for Carcinogenesis. *International Journal of Gynecological Pathology*. 19: 16 – 28
- Storey A und Banks L (1993)** **Human Papillomavirus type 16 E6 gene cooperates with EJ.ras to immortalize primary mouse calles.** *Oncogene*. 8: 919 – 24
- Storey A, Pim D, Murray A, Osborn K, Banks L, Crawford L (1988)** Comparison of the in vitro transforming activities of human papillomavirus types. *EMBO J*. 7: 1815 – 20
- Sun NC, Mc Caffee WM, Hun GJ, Weiner JM (1979)** Hemostatic abnormalities in malignancy, a prospective study in one hundred eight patients.Part 1. Coagulation studies. *Am J Clin Pathol*. 71: 10 –16
- Sun, SL, Thorner L, Lentz P, MacPherson, Botchan M (1990),** Identification of a 68-kilodalton nuclear ATP-binding phosphoprotein encoded by bovine papillomvirus type 1. *J Gen Virol*. 76: 819-26
- Sweet S und Singh G (1995)** Accumulation of human promyelocytic leukemic (HL-60) cells at two energetic cell cycle checkpoints. *Cancer Res*. Nov 15;55(22):5164-7
- Tabak HF und Arnberg AC (1986)** Splicing of yeast mitochondrial precursor RNAs. *Oxf Surv Eukaryot Genes*. 3:161-82. Review
- Takenaga K, Nakanishi H, Wada K, Suzuki M, Matsuzaki O, Matsuura A, Endo H (1997)** Increased expression of S100A4, a metastasis-associated gene, in human colorectal adenocarcinomas. *Clin Cancer Res*. 1997 Dec;3(12 Pt 1):2309-16
- Tamada Y, Takama H, Kitamura T, Yokochi K, Nitta Y, Ikeya T, Matsumoto Y (1994)** Identification of programmed cell death in normal human skin tissues by using specific labelling of fragmented DNA. *Br J Dermatol*. Oct;131(4):521-4
- Tan SH, Gloss B, Bernard HU (1992)** During negative regulation of the human papillomavirus-16 E6 promoter, the viral E2 protein can displace Sp1 from a proximal promoter element. *Nucleic Acids Res*. Jan 25;20(2):251-6

- Thiede B, Dimmler C, Siejak F, Rudel T (2001)** Predominant identification of RNA-binding proteins in Fas-induced apoptosis by proteome analysis. *J Biol Chem.* Jul 13; 276(28):26044-50
- Thierry F (1996)** HPV proteins in the control of HPV-transcription, In papillomavirus Review Current research on Papillomaviruses: 21 –28. Edited by A.Lacey, Leeds: Leeds University press
- Tiercy JM und Weil R (1983)** Serum-induced stimulation of nucleoplasmic and nucleolar transcription in mouse 3T3 fibroblasts revisited. *Eur J Biochem.* Mar 1;131(1):47-55
- Timme TL, Goltsov A, Tahir S, Li L, Wang J, Ren C, Johnston RN, Thompson TC (2000)** Caveolin-1 is regulated by c-myc and suppresses c-myc-induced apoptosis. *Oncogene.* Jul 6;19(29):3256-65
- Tombal B, Weeraratna AT, Denmeade SR, Isaacs JT (2000)** Thapsigargin induces a calmodulin/calcineurin-dependent apoptotic cascade responsible for the death of prostatic cancer cells. *Prostate.* Jun 1;43(4):303-17
- Tomkova H, Fujimoto W, Arata J (1999)** Expression pattern of the bcl-2 homologous protein bad in normal skin, psoriasis vulgaris and keratinocytic tumors. *J Dermatol Sci.* Feb;22(2):132-7
- Tschopp J, Thome M, Hofmann K, Meinel E (1998)** The fight of viruses against apoptosis. *Curr Opin Genet Dev.* Feb;8(1):82-7. Review
- Tse JY, Ng HK, Lau KM, Lo KW, Poon WS, Huang DP (1997)** Loss of heterozygosity of chromosome 14 q in low – and high-grade meningiomas. *Hum Pathol.* 28: 779 - 785
- Tsujimoto H, Nishizuka S, Redpath JL, Stanbridge EJ (1999)** Differential gene expression in tumorigenic and nontumorigenic HeLa x normal human fibroblast hybrid cells. *Mol Carcinog.* Dec;26(4):298-304
- Vaarala MH, Porvari KS, Kyllonen AP, Mustonen MV, Lukkariinen O, Vihko PT (1998)** Several genes encoding ribosomal proteins are over-expressed in prostate-cancer cell lines: confirmation of L7a and L37 over-expression in prostate-cancer tissue samples. *Int J Cancer.* Sep 25;78(1):27-32
- van Ranst M, Kaplan JB, Burk RD (1992)** Phylogenetic classification of human papillomaviruses: correlation with clinical manifestations. *J Gen Virol.* 73: 2653 – 60
- van Ranst M, Tachezy R , Delius H, Burk RD (1993)** Taxonomy of the human Papillomaviruses. *Papillomavirus Report.* 3: 61 – 65
- van Regenmortel MH, Fauquet CM, Bishop DHL (eds.) (2000)** Virus taxonomy Seventh Report, Academic Press, San Diego, Wien New York.
- Vessey CJ, Wilding J, Folarin N, Hirano S, Takeichi M, Soutter P, Stamp GW, Pignatelli M (1995)** Altered expression and function of E-cadherin in cervical intraepithelial neoplasia and invasive squamous cell carcinoma. *J Pathol.* Jun;176(2):151-9

- Viac J, Palacio S, Schmitt D, Claudy A (1997)** Expression of vascular endothelial growth factor in normal epidermis, epithelial tumors and cultured keratinocytes. *Arch Dermatol Res.* Feb;289(3):158-63
- Walker JE und Runswick MJ (1993)** The mitochondrial transport protein superfamily. *J Bioenerg Biomembr.* Oct;25(5):435-46. Review
- Ward BK, Mark PJ, Ingram DM, Minchin RF, Ratajczak T (1999)** Expression of the estrogen receptor-associated immunophilins, cyclophilin 40 and FKBP52, in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* Dec;58(3):267-80
- Watt FM (1989)** Terminal differentiation of epidermal keratinocytes. *Curr Opin Cell Biol* 1: 1107 – 15
- Wazer DE, Liu XL, Chu Q, Gao Q, Band V (1995)** immortalization of distinct human mammary epithelial cell types by human papilloma virus 16 E6 or E7. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Apr 25;92(9):3687-91
- Wei LH, Kuo ML, Chen CA, Cheng WF, Cheng SP, Hsieh FJ, Hsieh CY (2001)** Interleukin-6 in cervical cancer: the relationship with vascular endothelial growth factor. *Gynecol Oncol.* Jul;82(1):49-56
- Weis K, Griffiths G, Lamond AI (1994)** The endoplasmic reticulum calcium-binding protein of 55 kDa is a novel EF-hand protein retained in the endoplasmic reticulum by a carboxyl-terminal His-Asp-Glu-Leu motif. *J Biol Chem.* Jul 22;269(29):19142-50
- Weiske J, Schoneberg T, Schroder W, Hatzfeld M, Tauber R, Huber O (2001)** The fate of desmosomal proteins in apoptotic cells. *J Biol Chem.* Nov 2;276(44):41175-81
- Welter JF und Eckert RL (1995)** Differential expression of the fos and jun family members c-fos, fosB, Fra-1, Fra-2, c-jun, junB and junD during human epidermal keratinocyte differentiation. *Oncogene.* Dec 21;11(12):2681-7
- Welter JF und Eckert RL (1995)** Antitumor promotion by phenolic antioxidants: inhibition of AP-1 activity through induction of fra expression. *Proc Natl Acad Sci USA.* May 23; 92(11): 4972-6
- Werness BA, Levine AJ, Howley PM (1990)** Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science.* 248: 76 – 79
- Wernyi RP, Mattson MP, Christakos S (1999)** Expression of calbindin-D28k in C6 glial cells stabilizes intracellular calcium levels and protects against apoptosis induced by calcium ionophore and amyloid beta-peptide. *Brain Res Mol Brain Res.* Jan 22;64(1):69-79
- Wilding J, Vousden KH, Soutter WP, McCrea PD, Del Buono R, Pignatelli M (1996)** E-cadherin transfection down-regulates the epidermal growth factor receptor and reverses the invasive phenotype of human papilloma virus-transfected keratinocytes. *Cancer Res.* Nov 15;56(22):5285-92
- Wong TW, Yu HY, Kong SK, Fung KP, Kwok TT (2000)** The decrease of mitochondrial NADH dehydrogenase and drug induced apoptosis in doxorubicin resistant A431 cells. *Life Sci.* ;67(9):1111-8

- Woodworth CD, Doniger J, DiPaolo JA (1989)** immortalization of human foreskin keratinocytes by various human papillomavirus DNAs corresponds to their association with cervical carcinoma. *J Virol.* 63 : 159 – 64
- Woodworth CD, Waggoner S, Barnes W, Stoler MH, DiPaolo JA (1990)** Human cervical and foreskin epithelial cells immortalized by human papillomavirus DNAs exhibit dysplastic differentiation in vivo. *Cancer Res.* 50: 3709 – 15
- Yasumoto S, Burkhardt AL, Doniger J, DiPaolo JA (1986)** Human papillomavirus type 16 DNA-induced malignant transformation of NIH 3T3 cells. *J Virol.* Feb;57(2):572-7
- Yee C, Krishnan-Hewlett I, Baker CC , Schlegel R, Howley PM (1985)** Presence and Expression of Presence and expression of human papillomavirus sequences in human cervical carcinoma cell lines. *Am J Pathol.* Jun;119(3):361-6
- Yoshioka K, Deng T, Cavigelli M, Karin M (1995)** Antitumor promotion by phenolic antioxidants: inhibition of AP-1 activity through induction of Fra expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* May 23;92(11):4972-6
- Yousef GM, Chang A, Scorilas A, Diamandis EP (2000)** Genomic organization of the human kallikrein gene family on chromosome 19q13.3-q13.4. *Biochem Biophys Res Commun.* Sep 16;276(1):125-33
- Zajchowski DA, Bartholdi MF, Gong Y, Webster L, Liu HL, Munishkin A, Beauheim C, Harvey S, Ethier SP, Johnson PH (2001)** Identification of gene expression profiles that predict the aggressive behavior of breast cancer cells. *Cancer Res.* Jul 1;61(13):5168-78
- Zhang LH, Youn HD, Liu JO (2001)** Inhibition of cell cycle progression by the novel cyclophilin ligand Sanglifehrin A is mediated through the NFkappaB-dependent activation of p53. *J Biol Chem.* Sep 13
- Zhang Y, Deng Y, Luther T, Muller M, Ziegler R, Waldherr R, Stern DM, Nawroth PP (1994)** Tissue factor controls the balance of angiogenic and antiangiogenic properties of tumor cells in mice. *J Clin Invest.* Sep;94(3):1320-7
- Zhou Y und Chaplin DD (1993)** Identification in the HLA class I region of a gene expressed late in keratinocyte differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Oct 15;90(20):9470-4
- zur Hausen H (1976)** Condylomata acuminata and human genital cancer. *Cancer research.* Feb;36(2 pt 2): 794
- zur Hausen H (1977)** Human papillomaviruses and their possible role in squamous cell carcinomas. *Curr Top Microbiol Immunol.* 78: 1 – 30
- zur Hausen H (1991)** Viruses in human cancers. *Science.* 254: 1167 – 73
- zur Hausen H (1989)** Papillomaviruses in anogenital cancer as a model to understand the role of viruses in human cancer. *Cancer Research.* 49: 4677 – 81
- zur Hausen (1994)** Molecular pathogenesis of cancer of the cervix and its causation by specific human papillomavirustypes. In: zur Hausen (Herausgeber), Human Papillomaviruses, Current topics in Microbiology and Immunology CTMI, Vol. 186. Springer Verlag Heidelberg

6 ANHANG

6.1 Sequenzen der mit “Differential Display of mRNA” identifizierten Klone

Im folgenden sind alle Sequenzen der klonierten „Differential Display of mRNA“-cDNAs aufgeführt. Für die Sequenzabgleiche wurde der Basic Blast Search der NCBI Homepage benutzt (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST).

„Differential Display of mRNA” – Kłone

C2 1.Klon (U) (502 bp) :

[illegible]

Identities = 333/334 (99%), Strand = Plus / Plus

```

Query: 168      ttaattttttaaaaaggtttttattgagatacaagtc aataccataaagctctcacccttct 227
                |||
Sbjct: 6374     ttaattttttaaaaaggtttttattgagatacaagtc aataccataaagctctcacccttct 6433

Query: 228      aaagtgtagaattcagtggtgtgagtataattcataagatctatacttggtgtctattcat 287
                |||
Sbjct: 6434     aaagtgtagaattcagtggtgtgagtataattcataagattatacttggtgtctattcat 6493

Query: 288      aagacttatatccagcatattcataactagagccatatacacagatgcattcatcataata 347
                |||
Sbjct: 6494     aagacttatatccagcatattcataactagagccatatacacagatgcattcatcataata 6553

Query: 348      attccagacattttcatcaccctaaaaggaaaccctgaaacccattagcagtcattcccc 407
                |||
Sbjct: 6554     attccagacattttcatcaccctaaaaggaaaccctgaaacccattagcagtcattcccc 6613

Query: 408      attcctccaaccattctctcctaataccctagaaaccaccaatctgctgtgtatttcat 467
                |||
Sbjct: 6614     attcctccaaccattctctcctaataccctagaaaccaccaatctgctgtgtatttcat 6673

Query: 468      ctattgccaacatttcatataaaatggcatcatatc 501
                |||
Sbjct: 6674     ctattgccaacatttcatataaaatggcatcatatc 6707

```

Identities = 46/47 (97%), Strand = Plus / Plus

```
Query: 87      caagtccagaactgaatcctaagaaatgcaggctcgcaaagaaattg 133
              |||
Sbjct: 6303    caagtccagaactgaatcctaagaaatgcaggactgcaaagaaattg 6349
```

N1 1.Klon (R) (262 bp) :

CACATTGACATTAACTTACCTGAACATGAGAGAGATCACTGTCTTTAACTGTTGAAGAACTGCCAATGCACCGTCTTCATTGAATTCCTTTA
AAGCTTCAATAGCTCTTTTCTAATACTATGTGCAACTAGCCCTGAAAAAATAAAAGTTATCAGCTTTTAAATTTTTAGAAAAGATTTT
TTAGAGAAGACTATGTTGGCAATACAGGTACATGTGTGCCTTTACAATCTTCTACTCCCTTATCTATACCTG

[gi|13643225|ref|XM_004340.3|](#) Homo sapiens similar to NS1-associated protein 1 (H. sapiens)

Identities = 122/122 (100%), Strand = Plus / Minus

```

Query: 21  ctgaacatgagagagatcactgtctttaaactgttgaagaactgccaatgcaccgtcttc 80
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 281  ctgaacatgagagagatcactgtctttaaactgttgaagaactgccaatgcaccgtcttc 222

Query: 81  attgaattcttttaaagcttcaatagctctttcatctaaatcactatgtgcaactagccc 140
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 221  attgaattcttttaaagcttcaatagctctttcatctaaatcactatgtgcaactagccc 162

Query: 141  tg 142
          ||
Sbjct: 161  tg 160

```

Q1 1.Klon (U) (544 bp) :

CGGGCCAGAGCAACAGGAAGGAGATAGACCCATTATTCAGACAGATGATGTAATGTGAATAAAGAGTGAACATTTTCAAGTGTCTTTTCTCC
 TAATATTCTTCTATTTTCTTTAGAGAGAGAATAATCTTCAACCTGGAGAAAAGAGTCACGTAGCGGCTGATGGCTATCTTCAAGTAGCTGAAA
 GTCTATGATGTAAAGAGGATTTAAGCGTTTATAGAGCTCTGTGAGGTGGACTGAAGATCAGTGGTGAAGTACAGAAAGTACAGCCTAGCAGAG
 TGTGAGCAGATGAAGATGCAATGGCTGCCTCAGAAAGGCACCTCTGCTACTGGAGATACTTGTGTCACAACTTCAGCCACAATTCATGGGGA
 CCCTGCAGAAAGAGACCTTAAAGAGGCATCCAAGTAGCATTTCATAGTGTGAGGATATAAAGACAATACTCAGAAAATGAGCAAGAAGTCTTAGTAA
 TTCCCTCGGTTACCAAGTATAAGCAGGTAGGAAAATCTTTTTCGAGAAAGGTATCTGCACGGTTCACCTAAG
[gi|3228509|gb|AC004703.1|AC004703](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuclot/3228509) Homo sapiens chromosome 17, clone hRPC.1164_0_3, complete
 sequence

Identities = 259/259 (100%), Strand = Plus / Plus

Query: 136 acctggagaaaaaggtcacgtagcggctgatggctatcttcaagtagctgaaagtctatg 195
 |||
 Sbjct: 79778 acctggagaaaaaggtcacgtagcggctgatggctatcttcaagtagctgaaagtctatg 79837

Query: 196 atgtaaaaggagatttaagcggtttatagagctctgtgaggtggactgaagatcagtggtg 255
 |||
 Sbjct: 79838 atgtaaaaggagatttaagcggtttatagagctctgtgaggtggactgaagatcagtggtg 79897

Query: 256 aaaactacagaagtcagcctagcagagtgtcagcagatgaagatgcaatggctgcctcag 315
 |||
 Sbjct: 79898 aaaactacagaagtcagcctagcagagtgtcagcagatgaagatgcaatggctgcctcag 79957

Query: 316 aaggcactcctgtcactggagatacttgtttgtgcacaacttcagccacaattcatgggg 375
 |||
 Sbjct: 79958 aaggcactcctgtcactggagatacttgtttgtgcacaacttcagccacaattcatgggg 80017

Query: 376 accctgcagaagagaccct 394
 |||
 Sbjct: 80018 accctgcagaagagaccct 80036

Q1 2.Klon (R) (444 bp) :

GTTACTCCACCATTAGCACCCAAAGCTAAGATTCTAATTTAACTATTCTCTGTTCTTTTCATGGGGAAGCAGATTGGGTACCACCCAAGTATT
 GACTCACCCATCAACAACCGCTATGTATTTTCGTACATTACTGCCAGCCACCATGAATATTGTACGGTACCATAAATACTTGACCACCTGTAGTA
 CATAAAAACCCAATCCACATCAAAACCCCTCCTCATGCTTACAAGCAAGTACAGCAATCAACCTCAACTATCACACATCAACTTCAACTCCA
 AAGTCACCCCTCACCCATTAGGATACCAACAAACCTACCCACCTTAACAGTACATAGTACATAAAGCCATTTACCGTACATAGCACATTACAG
 TCAATCCCTTCTCGTCCCATGGATGACCCCTCAGATAGGGGTCCCTTGACCACCATCTCCGTT
[gi|13959823|ref|NC_001807.3|](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuclot/13959823) Human mitochondrion, complete genome

Identities = 436/440 (99%), Strand = Plus / Plus

Query: 4 actccaccattagcacccaaagctaagattctaatttaaactattctctgttctttcatg 63
 |||
 Sbjct: 15973 actccaccattagcacccaaagctaagattctaatttaaactattctctgttctttcatg 16032

Query: 64 gggaagcagatttgggtaccaccaagattgactcacccatcaacaaccgctatgtatt 123
 |||
 Sbjct: 16033 gggaagcagatttgggtaccaccaagattgactcacccatcaacaaccgctatgtatt 16092

Query: 124 tcgtacattactgccagccaccatgaatattgtacgggtaccataaataacttgaccacctg 183
 |||
 Sbjct: 16093 tcgtacattactgccagccaccatgaatattgtacgggtaccataaataacttgaccacctg 16152

Query: 184 tagtacataaaaaacccaatccacatcaaaacccctcctcatgcttacaagcaagtacag 243
 |||
 Sbjct: 16153 tagtacataaaaaacccaatccacatcaaaacccctcctcatgcttacaagcaagtacag 16212

Query: 244 caatcaaccctcaactatcacacatcaacttcaactccaaagtcacccctcaccattag 303
 |||
 Sbjct: 16213 caatcaaccctcaactatcacacatcaacttcaactccaaagtcacccctcaccattag 16272

Query: 304 gataccaacaaacctacccacccttaacagttacatagttacataaagccatttaccgtaca 363
 |||
 Sbjct: 16273 gataccaacaaacctacccacccttaacagttacatagttacataaagccatttaccgtaca 1633

Query: 364 tagcacattacagtc aaatcccttctcgtcccatggatgacccccctcagataggggtc 423
 |||
 Sbjct: 16333 tagcacattacagtc aaatcccttctcgtcccatggatgacccccctcagataggggtc 16392

Query: 424 ccttgaccaccatcctccgt 443
 |||
 Sbjct: 16393 ccttgaccaccatcctccgt 16412

Q6 1.Klon (R) (261 bp):

CGTACAGATCCTTCAAAAGGGCATCCAGCTCATGCTCGTCAATGTAGCCGCTTCTATCCTTGTCGTAAATGTGAAGATCGCGTTAACTCCTC
 TGAGGTCAGCTTCATGCCCTGAAATTTAAGCAGGAAGTTTCTGGACAGGCAGGAGTCGGGACATCTCTGAGAGGCCAATTTGCCATCCCCG
 TTCAAGTCAAACATCCGTAGTATGGTTTGGGTGTATTCTGGAGCTTGGGCTCATCGTACGGCCGGTTACCT
[gi|6031158|ref|NM_001740.2|](#) Homo sapiens calbindin 2, (29kD, calretinin) (CALB2), transcript
 variant CALB2, mRNA

Identities = 257/257 (100%), Strand = Plus / Minus

```
Query: 1   cgtacagatccttcaaaagggcatccagctcatgctcgtaaatgtagccgcttctatcct 60
          |||
Sbjct: 755 cgtacagatccttcaaaagggcatccagctcatgctcgtaaatgtagccgcttctatcct 696

Query: 61   tgtcgtataaatgtgaagatcgcgtaaaactcctctgaggtcagcttcatgccctgaaatt 120
          |||
Sbjct: 695 tgtcgtataaatgtgaagatcgcgtaaaactcctctgaggtcagcttcatgccctgaaatt 636

Query: 121  taagcaggaagtttcttgacaggcaggagtcgggacatctctgagaggcccaatttgc 180
          |||
Sbjct: 635 taagcaggaagtttcttgacaggcaggagtcgggacatctctgagaggcccaatttgc 576

Query: 181  catccccgttcaagtcaaacatccgtagtagtggttgggtgtattcctggagcttgggct 240
          |||
Sbjct: 575 catccccgttcaagtcaaacatccgtagtagtggttgggtgtattcctggagcttgggct 516

Query: 241  catcgtacggccggttc 257
          |||
Sbjct: 515 catcgtacggccggttc 499
```

Q6* 1. Klon (R) (264 bp)

TCCGCGGGGAGAAGTAGATTGAAGCCAGTTGATTAGGGTGCTTAGCTGTAACTAAGTGTGTTGGGTTTAAAGTCCCATTGGTCTAGTAAGGGCT
 TAGCTTAATTAAAGTGGCTGATTTCGCTTCAGTTGATGCAGAGTGGGGTTTGCAGTCCCTTAGCTGTTGCTCAGGCTGGAGTGCAGTGGCTATT
 CACAGGCGCGATCCCACTACTGATCAGCAGGGAGTTTGGACCTGCTCCGTTCCGACCTGGGCCGGTTACCTAA
[gi|13273284|gb|AF347015.1|AF347015](#) Homo sapiens mitochondrion, complete genome

Identities = 163/163 (100%), Strand = Plus / Minus

```
Query: 2   cggcgggagaagtagattgaagccagttgattagggcttagctgttaactaagtgttt 61
          |||
Sbjct: 5742 cggcgggagaagtagattgaagccagttgattagggcttagctgttaactaagtgttt 5683

Query: 62   gtgggtttaagtccattggtctagtaagggttagcttaattaaagtggctgatttgcg 121
          |||
Sbjct: 5682 gtgggtttaagtccattggtctagtaagggttagcttaattaaagtggctgatttgcg 5623

Query: 122  ttcagttgatgcagagtggtgttttgagtccttagctgttgc 164
          |||
Sbjct: 5622 ttcagttgatgcagagtggtgttttgagtccttagctgttgc 5580
```

S1 5.Klon (R) (362 bp):

CACAAGTCCACCATGCTTCTCTCTTCTTAGTCCACTGCTGTACCATTTCATTTCTGACATTTTCAGAGAGCTGAGGGGCGAGCTTCCACC
 ACAAAATTGATCATCTCTTCATTGTGAGAAATTGTGTGACTCTGTAATCACATTTGAAACGGTTTACCCTCCCTGACCTATCCATTGTAGCG
 CCTCCGCTGTCTTGCCGTTTGACCCGGGGAGGGCTGGTCTTGCACTCCAGGCCGAGGAATTTCTGATGTTGGATGAAAGCTCATTAGG
 AATTTCTGGAGTCTCTGGCAGCTCAGACTTATCTTGGCCAGCAGGTCCAGCATCTCCTTCTGCATCACTGGTGGRTAACAA
[gi|14149713|ref|NM_015650.1|](#) Homo sapiens microtubule-interacting protein that associates with
 TRAF3; DKFZP434F124 protein (DKFZP434F124), mRNA

Identities = 358/359 (99%), Strand = Plus / Minus

```
Query: 1   cacaagtcaccatgcttctcctcttcttagtccactgctgttaccatttcaatttc 60
          |||
Sbjct: 1425 cacaagtcaccatgcttctcctcttcttagtccactgctgttaccatttcaatttc 1366

Query: 61   tgacatttcagagagctgaggggcagcttccaccacaaattgatcatcctcttcattgtc 120
          |||
Sbjct: 1365 tgacatttcagagagctgaggggcagcttccaccacaaattgatcatcctcttcattgtc 1306

Query: 121  agaattgtgtgactctgtaatcacatttgaaacggttttaccactccctgacctatccat 180
          |||
Sbjct: 1305 agaattgtgtgactctgtaatcacatttgaaacggttttaccactccctgacctatccat 1246

Query: 181  ttgtagcgctccatgctgtcttgcggttgacccggggaggggctggtcttgcactccc 240
          |||
Sbjct: 1245 ttgtagcgctccatgctgtcttgcggttgacccggggaggggctggtcttgcactccc 1186
```

Query: 241 aggccgaggaattcttctgatgttgatgaaagctcattaggaatttctggagtctctgg 300
 |||||
 Sbjct: 1185 aggccgaggaattcttctgatgttgatgaaagctcattaggaatttctggagtctctgg 1126

Query: 301 cacctcagacttatcttggccagcaggtccagcatctccttctgcatcactggtggrgt 359
 |||||
 Sbjct: 1125 cacctcagacttatcttggccagcaggtccagcatctccttctgcatcactggtggagt 1067

S1 10.Klon (R) (361 bp):

CACGACAACAGGTAACCTTTAGTCAGAACTCACCACCCACTGTGTTAAGCCTTACATGACAATCACCATGAAGATTTACATACACATGTTATAT
 CATAGTCTCCTCACAACATGTCTAAGAGGTAGGCACGTCATTGTTCCCATTTGCAGATGAGGAAACTGAGGTTGATGAGAGGGCACTGGCTTG
 CCCAAAGTCACACAGCAGGGAGTGGCAGAGGAAGTCAGGTTGGGTGACCCAGTAACCTGCTCTCAGAGGCTGGGTGATGACCGGCTTCCTGGCTT
 CTCCTGGAATAAACCTTTGCCACCACTTCCTGCATTTCAGCTTCAGTACAGGCAGAGAATGGGGATAGGTGGAGTAACAA
[gi|13652841|ref|XM_009004.3|](#) Homo sapiens kallikrein 10 (KLK10), mRNA

Identities = 353/354 (99%), Gaps = 1/354 (0%), Strand = Plus / Minus

Query: 1 cacgacaacaggtaaccttttagtcagaactcaccacccactgtgttaagccttacatgac 60
 |||||
 Sbjct: 1441 cacgacaacaggtaaccttttagtcagaactcaccacccactgtgttaagccttacatgac 1382

Query: 61 aatcaccatgaagatttacatacacatgttatatcatagtctcctcacacatgtctaa 120
 |||||
 Sbjct: 1381 aatcaccatgaagatttacatacacatgttatatcatagtctcctcacacatgtctaa 1322

Query: 121 aggtaggcacgtcattgttcccatTTTgcagatgaggaaactgaggttcagagagggcac 180
 |||||
 Sbjct: 1321 aggtaggcacgtcattgttcccatTTTgcagatgaggaaactgaggttcagagagggcac 1262

Query: 181 ttggcttgcccaaagtcacacagcagggagtgagaggaagtcaggttgggtgaccc-a 239
 |||||
 Sbjct: 1261 ttggcttgcccaaagtcacacagcagggagtgagaggaagtcaggttgggtgacccca 1202

Query: 240 gtaactgctctcagaggctgggtgatgaccggcttctctggcttctctggaataaaccttt 299
 |||||
 Sbjct: 1201 gtaactgctctcagaggctgggtgatgaccggcttctctggcttctctggaataaaccttt 1142

Query: 300 gccaccacttctgcatttcagcttcagtcacaggcagagaatggggataggtgg 353
 |||||
 Sbjct: 1141 gccaccacttctgcatttcagcttcagtcacaggcagagaatggggataggtgg 1088

S2 1.Klon (R) (252 bp):

CAGAGTCTGATCTTATTTATTTGTTACTCAAAAAATCTTATTTCTGACTGGATACAGACTTAGAAGTAGAAGCTCGCAGAGAGGAAAGTCTGCG
 TCTCTTCGCAATTTGTTCTCGGCGCTTCTCCTTAGCCTCCTTCATTCTCTTGGCCAAAAGTTAGCATATTCTGCAGCCTCTCTTTATTTTTC
 TTGGTACGCTGCTTCTTCAGAGCAATACGCCGCCGTTTGTGCTGCAGGACACGTGGAGTAACAA
[gi|12653504|gb|BC000524.1|BC000524](#) Homo sapiens, Similar to ribosomal protein S6, clone
 MGC:8597

Identities = 251/252 (99%), Strand = Plus / Minus

Query: 1 cagagtctgatcttattttattgttactcaaaaaatcttatttctgactggatacagact 60
 |||||
 Sbjct: 800 cagagtctgatcttattttattgttactcaaaaaatcttatttctgactggattcagact 741

Query: 61 tagaagtagaagctcgagagaggaaagctgctgctctctcgcaatttgttctctggcgct 120
 |||||
 Sbjct: 740 tagaagtagaagctcgagagaggaaagctgctgctctctcgcaatttgttctctggcgct 681

Query: 121 tctccttagcctccttcattctcttggccaaaagttagcatattctgcagcctcttctt 180
 |||||
 Sbjct: 680 tctccttagcctccttcattctcttggccaaaagttagcatattctgcagcctcttctt 621

Query: 181 tatttttcttggtacgctgcttcttcagagcaatacgccgccgtttgtgctgcaggacac 240
 |||||
 Sbjct: 620 tatttttcttggtacgctgcttcttcagagcaatacgccgccgtttgtgctgcaggacac 561

Query: 241 gtggagtaacaa 252
 |||||
 Sbjct: 560 gtggagtaacaa 549

S3 1.Klon (R) (156 bp):

TTGTTACTCCACCTCAATCACACTACTCCCCATATCTAACAACGTAAAAATAAATGACAGTTTGAACATACAAAACCCACCCCATTCCTCCCC
 AACTCATCGCCCTTACCACGCTACTCCTACCTATCTCCCTTTTATACTAATAATCTTATG
[gi|13273284|gb|AF347015.1|AF347015](#) Homo sapiens mitochondrion, complete genome

Identities = 151/151 (100%), Strand = Plus / Plus

Query: 5 tactccacctcaatcacactactccccatatctaacaacgtaaaaataaaatgacagttt 64
 |||||
 Sbjct: 5362 tactccacctcaatcacactactccccatatctaacaacgtaaaaataaaatgacagttt 5421

Query: 65 gaacatacaaaaacccacccattctctcccccacactcatcgcccttaccacgctactccta 124
 |||||
 Sbjct: 5422 gaacatacaaaaacccacccattctctcccccacactcatcgcccttaccacgctactccta 5481

Query: 125 cctatctcccccttttataactaataatcttat 155
 |||||
 Sbjct: 5482 cctatctcccccttttataactaataatcttat 5512

T1 3.Klon (R) (345 bp):

CTTCTTTCTACCCACAACACTTTCTCGGCCTATCCGGAATGCCCCGACGTTACTCGGACTACCCCGATGCATACACCACATGAAACATCCTATC
 ATCTGTAGGCTCATTCATTTCTCTAACAGCAGTAATATTAATAATTTTCATGATTTGAGAAGCCTTCGCTTCGAAGCGAAAAGTCCTAATAGTA
 GAAGAACCCTCCATAAACCTGGAGTGACTATATGGATGCCCCCACCCTACCACACATTGGAAGAACCCTGATACATAAAATCTAGACAAAAA
 GGAAGGAATCGAACCCCCAAAGCTGGTTTCAAGCCAACCCCATGGCCTCCATGACTTTTTTCG

[gi|13273284|gb|AF347015.1|AF347015](#) Homo sapiens mitochondrion, complete genome

Identities = 340/341 (99%), Strand = Plus / Plus

Query: 4 ctttctaccacacaacacttttctcggcctatccggaatgccccgacgttactcggactacc 63
 |||||
 Sbjct: 7175 ctttcttcccacacaacacttttctcggcctatccggaatgccccgacgttactcggactacc 7234

Query: 64 ccgatgcatacaccacatgaaacatcctatcatctgtaggctcattcatttctctaacag 123
 |||||
 Sbjct: 7235 ccgatgcatacaccacatgaaacatcctatcatctgtaggctcattcatttctctaacag 7294

Query: 124 cagtaatattaataattttcatgatttgagaagccttcgcttcgaagcgaaaagtcccta 183
 |||||
 Sbjct: 7295 cagtaatattaataattttcatgatttgagaagccttcgcttcgaagcgaaaagtcccta 7354

Query: 184 tagtagaagaaccctccataaacctggagtgactatatggatgccccccaccctaccaca 243
 |||||
 Sbjct: 7355 tagtagaagaaccctccataaacctggagtgactatatggatgccccccaccctaccaca 7414

Query: 244 cattcgaagaaccggtatacataaaatctagacaaaaaaggaaggaatcgaaccccccaa 303
 |||||
 Sbjct: 7415 cattcgaagaaccggtatacataaaatctagacaaaaaaggaaggaatcgaaccccccaa 7474

Query: 304 agctggtttcaagccaaccccatggcctccatgactttttc 344
 |||||
 Sbjct: 7475 agctggtttcaagccaaccccatggcctccatgactttttc 7515

U5 6.Klon (U) (351 bp):

CAGGAATACATTTGGAAATTCAAAACAATTGGCAAACCTTTGTATTAATGTGTTAAGTGCAGGAGACATTGGTATTCTGGGCACTTCCTAATATG
 CTTTACAATCTGCACTTTAACTGACTTAAGTGGCATTAAACATTTGAGAGCTAATATATTTTATAAGACTACTATACAACTACAGAGTTTA
 TGATTTAAGGTACTTAAAGCTTCTATGGTTGACATTGTATATATAATTTTAAAAAGGTTTCTATATGGGGATTCTATTTATGTAGGTAA
 TATTGTTCTATTTGATATATTGAGATAATTTATTAATATACCTTAAACAAAGGTGACTGGGAATTGT

[gi|11421538|ref|XM_001322.1|](#) Homo sapiens coagulation factor III (thromboplastin, tissue factor)

(F3), mRNA

Identities = 350/352 (99%), Gaps = 1/352 (0%), Strand = Plus / Plus

Query: 1 caggaatacatatttgaaattcaaaacaattggcaaactttgtattaatgtgttaagtgc 60
 |||||
 Sbjct: 1799 caggaatacatatttgaaattcaaaacaattggcaaactttgtattaatgtgttaagtgc 1858

Query: 61 ggagacattggtattctctgggca-cttcctaataatgctttacaatctgcactttaactgac 119
 |||||
 Sbjct: 1859 ggagacattggtattctctgggcaccttcctaataatgctttacaatctgcactttaactgac 1918

Query: 120 ttaagtggcattaaacatttgagagctaactataatttttataagactactatacaaaacta 179
 |||||
 Sbjct: 1919 ttaagtggcattaaacatttgagagctaactataatttttataagactactatacaaaacta 1978

Query: 180 cagagtttatgatatttaaggtacttaagcttctatggttgacattgtatatataattttt 239
 |||||
 Sbjct: 1979 cagagtttatgatatttaaggtacttaagcttctatggttgacattgtatatataattttt 2038

Query: 240 taaaaagggttttctatatatggggattttctatattatgtaggtaattgttctatttgtat 299
 |||||
 Sbjct: 2039 taaaaagggttttctatatatggggattttctatattatgtaggtaattgttctatttgtat 2098

Query: 300 atattgagataattttatttaataatactttaacaaagggtgactgggaattgt 351
 |||||
 Sbjct: 2099 atattgagataattttatttaataatactttaacaaagggtgactgggaattgt 2150

12/3 1.Klon (R) (214 bp) :

TCAGTACACTTACCATGTTACGACTTGTCTCCTCTATATAAATGCGTAGGGGTTTTAGTTAAATGTCCTTTGAAGTATACTTGAGGAGGGTGAC
GGGCGGTGTGTACGCGCTTCAGGGCCCTGTTCAGCTAAGCACTCTACTCTCAGTTTACTGCTAAATCCACCTTCGACCCCTTAAGTTTCATAAGG
GCTATCGTAGTTTTCTGGGGTAGAAAGA
[gi|13273284|gb|AF347015.1|AF347015](#) Homo sapiens mitochondrion, complete genome

Identities = 212/213 (99%), Strand = Plus / Minus

Query: 2 cagtacacttaccatgtttacgacttgtctcctctatataaatgcgtaggggttttagtta 61
|||||
Sbjct: 1583 cagtacacttaccatgtttacgacttgtctcctctatataaatgcgtaggggttttagtta 1524

Query: 62 aatgtcctttgaagtatacttgaggagggtagcggcggtgtgtacgcgcttcagggccc 121
|||||
Sbjct: 1523 aatgtcctttgaagtatacttgaggagggtagcggcggtgtgtacgcgcttcagggccc 1464

Query: 122 tgttcagctaagcactctactctcagtttactgctaaatccaccttcgacccttaagttt 181
|||||
Sbjct: 1463 tgttcaactaagcactctactctcagtttactgctaaatccaccttcgacccttaagttt 1404

Query: 182 cataagggtatcgtagttttctgggtagaaa 214
|||||
Sbjct: 1403 cataagggtatcgtagttttctgggtagaaa 1371

22/3 1.Klon (R) (214 bp) :

CACCACAACAGATTTAATAATAGTGAAAACTATGAAATGCTCCAAGAATTATCACAATATACGGGACATGAAAGGRGAAGTTTATTGGAAAC
ATGGCACCAATAGACTGGCTCAACGCAGAGTTGCCATAAACCTTCCATTGTAAAAAATGCATTATTGCAAAGTGCAATAAAGCAAAACGCAA
TAAGATGACATATGCTGTATCGAAA
[gi|7688696|gb|AF157323.1|AF157323](#) Homo sapiens p45SKP2-like protein mRNA, complete cds

Identities = 139/141 (98%), Strand = Plus / Minus

Query: 70 tgaaaggrgaagttttattggaacatggcaccaatagactggctcaacgcagagttgcc 129
|||||
Sbjct: 3246 tgaaaggagaagttttattggaacatggcaccaatagactggctcaacgcagagttgcc 3187

Query: 130 ataaaccttcatttgtaaaaaatgcattatttgcaaagtgaataaagcaaacgcaat 189
|||||
Sbjct: 3186 ataaaccttcatttgtaaaaaatgcattatttgcaaagtgaataaagcaaacgcaat 3127

Query: 190 aagatgacatatgcctgtatc 210
|||||
Sbjct: 3126 aagatgacatatgcctgtatc 3106

22/4 1.Klon (R) (263 bp) :

ATCGCTGGGGTGACCATTGCTTTATTAGAACTATTGATGTCCATAGTGGTTATGATATTTCCCTCAACCCCTTTAAATCTGATCCCYTTCTAT
GCTGGTTCTCGGCATCATGATTTCCACCACATGACTTCATTGGAACATATGTTCAACATTTACATGGTGGGATCGAATTTTGGACAGACTCTCA
GTATAATGGCTATAATGTAAAGAGGGAGAAGTTTGAGAAAAAGACTGAATAAATATCTCACGTAAACCTTCTCTGC
[gi|12730657|ref|XM_003480.2|](#) Homo sapiens sterol-C4-methyl oxidase-like (SC4MOL), mRNA

Identities = 249/259 (96%), Gaps = 5/259 (1%), Strand = Plus / Plus

Query: 8 gggtagaccattcgtttattagaaactattgatgtccatagtggttatgatattccctca 67
|||||
Sbjct: 737 gggtagaccattcgtttattagaaactattgatgtccatagtggttatgatattcctctca 796

Query: 68 accccttttaaatctgatcccyttctatgctggttctcgcatcatgatttccaccacatg 127
|
Sbjct: 797 a-cccttttaaatctgatccctttctatgctggttctcgcatcatgatttccaccacatg 855

Query: 128 -acttcattgg-aactatg-ttcaacatttacatggtgggatcgaatttttgg-acagac 183
|||||
Sbjct: 856 aacttcattggaaactatgcttcaacatttacatggtgggatcgaatttttggacagac 915

Query: 184 tctcagtataatggctataatgtaaagaggagaagtttgagaaaaagactgaataaata 243
|||||
Sbjct: 916 tctcagtataatgcctataatgtaaagaggagaagtttgagaaaaagactgaataaata 975

Query: 244 tctcacgtaaacccttctg 262
|||||
Sbjct: 976 tctcacgtaaacccttctg 994

23/13.Klon (U) (411 bp):

AGAAAAAGCSGGCATAAAGCACTTTTATTGCAATAATAAACTTGAGACTCATAAATGGTGCTGGGGGAAGGGTGCAGCAACGCAACGATTT
CTCACCAAATYACTACACAGGACAGCAAAGGGGTGAGAAGGGGCTGAGGGAGGAAAAGCCAGGAACTGAGATCAGCAGAGGGAGCCAAGCATC
AAAAAMAGGAGATGCTGAAGCTGCGATGACCAGCATCATTTTYYTAAGAGAACATTCAGGATTTGTCATGATGGCTGGGCTTTCCTGGGTG

TTAAGTCTAMAAAMAGCACCTTCAATTGAACTGTCAATTAAAGTTCTTAAGATTTAGGAAGTGGTGGAGCTTGAAAGTTATGAGATTACAAA
 ATTCTTGAAAGTCCATTAGAAAAACACAGGATGA
[gi|12804944|gb|BC001925.1|BC001925](#) Homo sapiens, FK506-binding protein 1A (12kD), clone
 MGC:3950, mRNA,

Identities = 384/408 (94%), Gaps = 7/408 (1%), Strand = Plus / Minus

```

Query: 4   aaaagcsggcataaaagcactttttattgcaataataaaaacttgagactcataaatggtg 63
          ||||| ||||||||||||||| ||||||||||||||| |||||||||||||||
Sbjct: 1502 aaaagccggcataaaagcactttt-attgcaataataaaa-cttgagactcataaatggtg 1445

Query: 64   ctgggggaaggggtgcagcaacgcaacgatttctcaccaaatyactacacaggacagcaaa 123
          ||||||||||||||||||| ||||||||||||||| |||||||||||||||
Sbjct: 1444 ctgggggaaggggtgcagcaacg-----atttctcaccaaatcactacacaggacagcaaa 1390

Query: 124   ggggtgagaaggggctgagggaggaaaagccaggaaaactgagatcagcagagggagccaa 183
          ||||||||||||||||||| ||||||||||||||| |||||||||||||||
Sbjct: 1389 ggggtgagaaggggctgagggaggaaaagccaggaaaactgagatcagcagagggagccaa 1330

Query: 184   gcatcaaaaaamaggagatgctgaagctgcatgaccagcatcannnnnnnaagagaaca 243
          ||||||||| ||||||||||||||| ||||||||||||||| |||||||||
Sbjct: 1329 gcatcaaaaaacaggagatgctgaagctgcatgaccagcatcattttcttaagagaaca 1270

Query: 244   ttcaaggatttgtcatgatggctgggctttcactgggtgttaagctnnnnnnngcacct 303
          ||||||||||||||||||| ||||||||||||||| |||||||||
Sbjct: 1269 ttcaaggatttgtcatgatggctgggctttcactgggtgttaagctctacaaacagcacct 1210

Query: 304   tcaattgaaactgtcaattaaagttcttaagatttaggaagtggaggcttgaaagt 363
          ||||||||||||||||||| ||||||||||||||| |||||||||||||||
Sbjct: 1209 tcaattgaaactgtcaattaaagttcttaagatttaggaagtggaggcttgaaagt 1150

Query: 364   atgagattacaaaattcctgaaagtccattagaaaaaccacaggatga 411
          ||||||||||||||||||| |||||||||||||||
Sbjct: 1149 atgagattacaaaattcctgaaagtccattagaaaaaccacaggatga 1102

```

24A/1 10. Klon (R) (452 bp) :

TCGGCAAAATAATTTTATTTCTTAACATATGGTAACATATACATCCAATATGTGCTCCCCTTGACATCTATTTCACAAGTGACTTCCAAATGAC
 AACTGCTTTGATATTTAAGCATGTGCTAAAAGTTATCTTAGTTGAGATATGAAAAATGCTTTAGATGGATAACATTCTGAGTATATTGGATTAG
 TCACAGCAGAAATTTACTTTTAGTTAGATGAGTTCTACAAATTTAAAGCTTTGAAAAGCTACTACTTTTACTTCTAATACATCCAGATGAACACGA
 TGTAGCAATATCAGCTTGTATTCCAGAGAAATCTCATTAGTTTTTCTGGTGATGGAACCACTTATCCACGCTGTGGTACTGTGCAGGCAGAT
 TCACAGGCGCGATCCCACTACTGATCAGCACGGGAGTTTTGACCTGCTCCGTTTCCGACCTGGGCCGGTTCCACCTA
[gi|11526786|gb|AF217186.1|AF217186](#) Homo sapiens inorganic pyrophosphatase 1 (PPA1) mRNA,
 complete cds

Identities = 383/383 (100%), Strand = Plus / Minus

```

Query: 1   tcggcaaaataattttatttcctaacatatggtaacatatacatccaatatgtgctcccc 60
          ||||||||||||||||||| ||||||||||||||| |||||||||||||||
Sbjct: 1188 tcggcaaaataattttatttcctaacatatggtaacatatacatccaatatgtgctcccc 1129

Query: 61   ttgcacatctattcacaagtgacttccaaatgacaactgctttgatatttaagcatgtgc 120
          ||||||||||||||||||| ||||||||||||||| |||||||||||||||
Sbjct: 1128 ttgcacatctattcacaagtgacttccaaatgacaactgctttgatatttaagcatgtgc 1069

Query: 121   taaaagttatcttagttgagatatgaaaaatgcttttagatggataacattctgagtatat 180
          ||||||||||||||||||| ||||||||||||||| |||||||||||||||
Sbjct: 1068 taaaagttatcttagttgagatatgaaaaatgcttttagatggataacattctgagtatat 1009

Query: 181   tggattagtcacagcagaatttacttttagttagatgagttctacaaatttaaagctttga 240
          ||||||||||||||||||| ||||||||||||||| |||||||||||||||
Sbjct: 1008 tggattagtcacagcagaatttacttttagttagatgagttctacaaatttaaagctttga 949

Query: 241   aaagctactacttttacttctaatacatccagatgaacacgatgtagcaatatcagcttg 300
          ||||||||||||||||||| ||||||||||||||| |||||||||||||||
Sbjct: 948 aaagctactacttttacttctaatacatccagatgaacacgatgtagcaatatcagcttg 889

Query: 301   tattccagagaaatctcattagtttttctgggtgatggaaccacttatccacgtctgttgg 360
          ||||||||||||||||||| ||||||||||||||| |||||||||||||||
Sbjct: 888 tattccagagaaatctcattagtttttctgggtgatggaaccacttatccacgtctgttgg 829

Query: 361   tactgtgcaggcagattcacagg 383
          |||||||||
Sbjct: 828 tactgtgcaggcagattcacagg 806

```

24B/1 1.Klon (R) (245 bp) :

GTTACTCCACCCATAATAAGAGAATGTTCTACTCACAACCTTCAGCTGGGTACATCCATCCCTCCATTCATCCTTCCATCCATCTTTCCATCCA
 TTACCTCCATCCATCCTTCCAACATATATTTATTGAGTACCTACTGTGTGCCAGGGGCTGGTGGGACAGTGGTGACATAGTCTCTGCCCTCATA
 GAGTTGATTGTCTAGTGAGGAAGACAAGCATTTTTTAAAAATAAATTTAACTTACG

[gi|13639130|ref|XM_002202.3|](#) Homo sapiens laminin, gamma 2 (nicein (100kD), kalinin (105kD), BM600, (100kD), Herlitz junctional epidermolysis bullosa), (LAMC2), mRNA

Identities = 129/129 (100%), Strand = Plus / Plus

```
Query: 116  acatatattttattgagtagctactgtgtgccaggggctggtgggacagtgggtgacatagt 175
          |||
Sbjct: 4702  acatatattttattgagtagctactgtgtgccaggggctggtgggacagtgggtgacatagt 4761

Query: 176  ctctgccctcatagagttgattgtctagttaggaagacaagcatttttaaaaaataaatt 235
          |||
Sbjct: 4762  ctctgccctcatagagttgattgtctagttaggaagacaagcatttttaaaaaataaatt 4821

Query: 236  taaacttac 244
          |||
Sbjct: 4822  taaacttac 4830
```

Identities = 47/47 (100%), Strand = Plus / Plus

```
Query: 5      ctccaccataataagagaatgttctactcacacttcagctgggtc 51
          |||
Sbjct: 4591  ctccaccataataagagaatgttctactcacacttcagctgggtc 4637
```

33/1 4.Klon (R) (424 bp) :

CGGGGGAAGGCGCTTTGTGAAGTAGGCCTTATTTCTCTTGTCTTTCGTACAGGGGGAATTTGAAGTAGATAGRAACCGCCTGGGTTACTCC
GGTCTGAACCTCAGATCAGTAGGACTTTAATCGTTGAACAAACGGACCTTTAATAGCGGCTGCACCATCGGGGTGTCTGATCCAACATCGGGG
TCGTAACCCCTTTTGTGTGATATGGACTCTAGAATAGGATTGCGCTGTATCCCTAGGGTAAGTTGTCCGTTGGTCAAGTTATTGGTTCAATTG
AGTATAGTAGTTTCGCTTTGACTGGTGAAGTCTTAGCATGTACTGCTCGGAGGTTGGGTTCTGCTCCGAGGTCGCCCCAACCGAAATTTTAAATG
CAGGTTTGGTAGTTTAGGACCTGTGGGTTTCTTAGCG

[gi|14043094|gb|BC007531.1|BC007531](#) Homo sapiens, Similar to protein phosphatase 1G (formerly 2C), magnesium-dependent, gamma isoform, clone MGC:15286, mRNA, complete cds

Identities = 401/411 (97%), Strand = Plus / Minus

```
Query: 1      cgggggaaggcgctttgtgaagtaggccttatttctcttgcctttcgtacaggggggaa 60
          |||
Sbjct: 1598  cgggggaaggcgctttgtgaagtaggccttatttctcttgcctttcgtacagggaggaa 1539

Query: 61     tttgaagtagatagraaccgcccctgggttactccgggtctgaactcagatcacgtaggact 120
          |||
Sbjct: 1538  tttgaagtagatagaaaccgacctggattactccgggtctgaactcagatcacgtaggact 1479

Query: 121    ttaatcgttgaacaaacggacctttaatagcggctgcaccatcggggtgtcctgatccaa 180
          |||
Sbjct: 1478  ttaatcgttgaacaaacgaacctttaatagcggctgcaccatcgggatgtcctgatccaa 1419

Query: 181    catcggggtcgtaaacccttttgttgatattgactctagaataggattgcgctgttatcc 240
          |||
Sbjct: 1418  catcgaggtcgtaaaccctattgttgatattgactctagaataggattgcgctgttatcc 1359

Query: 241    ctagggttaacttgttccgttggtcaagttattggttcaattgagtatagtagttcgcttt 300
          |||
Sbjct: 1358  ctagggttaacttgttccgttggtcaagttattggatcaattgagtatagtagttcgcttt 1299

Query: 301    gactggtgaagtcttagcatgtactgctcggaggttgggttctgctccgaggtcgcccca 360
          |||
Sbjct: 1298  gactggtgaagtcttagcatgtactgctcggaggttgggttctgctccgaggtcgcccca 1239

Query: 361    accgaaatttttaatgcaggtttggtagtttaggacctgtgggtttktttag 411
          |||
Sbjct: 1238  accgaaatttttaatgcaggtttggtagtttaggacctgtgggtttgttag 1188
```

33/5 1.Klon (R) (197 bp) :

CGGTAAATTGTAATTTTTTTTATTGGAACAAATATACAACCTTGAATGGATTTTGAAGCAAAATTGTGCCATAAGCAGATTTAAGTGGCTAAA
CAAAGTTTAAAAAGCAAGTAACAATAAAAGAAAATGTTTCTGGTACAGGACCAGCAGTACAAAAAATAGTGTACGAGTACCTGGATAATACAC
CGTTTCAA

[gi|13097164|gb|BC003354.1|BC003354](#) Homo sapiens, calmodulin 2 (phosphorylase kinase, delta), clone, MGC:5226, mRNA, complete cds

Identities = 167/174 (95%), Strand = Plus / Minus

```
Query: 21     attggaaaacaaatatacaacttgaatggattttgaggcaaattgtgccataagcagat 80
          |||
Sbjct: 1096  attggaaaacaaatatacaacttgaatggattttgaggcaaattgtgccataagcagat 1037

Query: 81     ttttaagtggctaacaagtttaaaaaagcaagtaacaataaaaagaaaatgtttctggtac 140
          |||
Sbjct: 1036  ttttaagtggctaacaagtttaaaaaagcaagtaacaataaaaagaaaatgtttctggtac 977
```

Query: 141 aggaccagcagtagtacnnnnnnntagtgtacgagtacctggataatacacccgttt 194
 |||
 Sbjct: 976 aggaccagcagtagtacaaaaaaatagtgtacgagtacctggataatacacccgttt 923

33/6 1.Klon (198 bp) :

CGGGTAAATTGTAATTTTTTTTATTGAAAAACAAATATACAACCTTGAATGGATTTTGAGGCAAATTGTGCCATAAGCAGATTTTAAAGTGGCTAA
ACAAAGTGTAAAAAGCAAGTAACAATAAAAGAAAAATGTTTCTGGTACAGGACCAGCAGTACAAAAAAATAGTGTACGAGTACCTGGATAATACA
CCCGTTTCAA
[gi|13623674|gb|BC006464.1|BC006464](#) Homo sapiens, calmodulin 2 (phosphorylase kinase, delta),
clone, MGC:2168, mRNA, complete cds

Identities = 167/174 (95%), Strand = Plus / Minus

```

Query: 22      attggaacaaatatacaacttggaatggattttgaggcaaattgtgccataagcagat 81
              |||
Sbjct: 1098    attggaacaaatatacaacttggaatggattttgaggcaaattgtgccataagcagat 1039

Query: 82      ttaagtggctaacaagtttaaaaagcaagtaacaataaaagaaaatgtttctgttac 141
              |||
Sbjct: 1038    ttaagtggctaacaagtttaaaaagcaagtaacaataaaagaaaatgtttctgttac 979

Query: 142     aggaccagcagtacnnnnnnntagtgtagtgtagtacctggataatacacccggtt 195
              |||
Sbjct: 978     aggaccagcagtacaaaaaaatagtgtagtgtagtacctggataatacacccggtt 925

```

36/1 3.Klon (R) (317 bp) :

CGGGGGGCGACCTCGGAGCAGAACCCAACCTCCGAGCAGTACATGCTAAGACTTCACCAGTCAAAGCGAACTACTATACTCAATTGATCCAATA
ACTTGACCAACGGAACAAGTTACCTTAGGGATAACAGCGCAATCCTATTCTAGAGTCCATATCAACAATAGGGTTTACGACCTCGATGTTGGAT
CAGGACATCCCGATGGTGCAGCCGCCCTATAAAGGTTCTGTTTGTTCACGATTAAAGTCTACGTGATCTGAGTTCAGACCCGGAGTAATCCAGGT
CGGTTTCTATCTACTTCAATTCCTCCCTGTACCG

[gi|13273284|gb|AF347015.1|AF347015](#) Homo sapiens mitochondrion, complete genome

Identities = 312/313 (99%), Strand = Plus / Plus

```

Query: 28      ggggcgacctcggagcagaacccaacctccgagcagtagcatgctaagacttcaccagtca 87
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 2816    ggggcgacctcggagcagaacccaacctccgagcagtagcatgctaagacttcaccagtca 2875

Query: 88      aagcgaactactatactcaattgatccaataacttgaccaacggaacaagttaccctagg 147
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 2876    aagcgaactactatactcaattgatccaataacttgaccaacggaacaagttaccctagg 2935

Query: 148     gataacagcgcaatcctattctagagtccatatcaacaatagggtttacgacctcgatgt 207
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 2936    gataacagcgcaatcctattctagagtccatatcaacaatagggtttacgacctcgatgt 2995

Query: 208     tggatcaggacatcccgatggtgcagccgccattaaaggttcgtttgttcaacgattaaa 267
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 2996    tggatcaggacatcccgatggtgcagccgcctattaaaggttcgtttgttcaacgattaaa 3055

Query: 268     gtcctacgtgatctgagttcagaccggagtaatccagggtcggtttctatctacttcaaat 327
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 3056    gtcctacgtgatctgagttcagaccggagtaatccagggtcggtttctatctacttcaaat 3115

Query: 328     tcctccctgtacg 340
              ||||||||||||
Sbjct: 3116    tcctccctgtacg 3128

```

36/1 4.Klon (R) (310 bp) :

CGCAAGAACCAGTTGTTTTGTCTTGGGGTCTGTGAGGGTTGGAAAGTCCAAGCCGTAGACCCAGTTTCCTTTCTTAGCTGATGTCTTTGGCCA
GAACACCGTGGGCTGTACTTTGAGTTGTAGTTGGAAGCGGTTTGCATTTACGCCCTGTAATGTATTTCATTCCTTAATTTATGTAAGGTTTTTTTTG
TAGCAATTCCTCGATTCTTTGAAAGATGACACAACAAATTTGGTTTTCTACTGTTATGTGAGAACATTAGGCCCCAGCAACACGTCAATTGTGTA
AGGAAAAATAAAAGTGCTGCCGTAACCG
[gi|13938580|gb|BC007442.1|BC007442](#) Homo sapiens, actin, gamma 1, clone MGC:4484, mRNA,
complete cds

Identities = 300/309 (97%), Gaps = 1/309 (0%), Strand = Plus / Plus

```

Query: 2      gcaagaaccagttgttttgccttcgaggctctgtcagggttggaagtccaagccgta-ga 60
             |||
Sbjct: 1605   gcaagaaccagttgttttgccttcgaggctctgtcagggttggaagtccaagccgtagga 1664

Query: 61      cccagtttccttcttagctgatgtctttggccagaacaccgtgggctgttacttgcttt 120
             |||
Sbjct: 1665   cccagtttccttcttagctgatgtctttggccagaacaccgtgggctgttacttgcttt 1724

```

Query: 121 gagttggaagcgggtttgcatttacgcctgtaaagtattcattcttaatttatgtaaggn 180
 |||
 Sbjct: 1725 gagttggaagcgggtttgcatttacgcctgtaaagtattcattcttaatttatgtaaggt 1784

Query: 181 nnnnnnngtacgcaattctcgattctttgaagagatgacaacaaattttggttttctact 240
 |||
 Sbjct: 1785 tttttttgtacgcaattctcgattctttgaagagatgacaacaaattttggttttctact 1844

Query: 241 gttatgtgagaacattaggccccagcaacacgtcattgtgtaaggaaaaataaaagtgc 300
 |||
 Sbjct: 1845 gttatgtgagaacattaggccccagcaacacgtcattgtgtaaggaaaaataaaagtgc 1904

Query: 301 gccgtaacc 309
 |||
 Sbjct: 1905 gccgtaacc 1913

36/3 2.Klon (288 bp) :

CGCAAGAACAGTATTCATAGGATAAACAAATAGCAAATGTACAGCCTTGGCTTCCCCACATTGGGCTGACCGTGTCTCTCTAGTTGAACCTG
 GGAACAATTTCCAAACTGTCCAGGGCGGGGGTTCGCTCTCAATCTCCCTGGGGCACTTTCATCCTCAAGCTCAGGGCCCATCCCTTCTCTGCA
 GCTCTGACCCAAATTTAGTCCAGAAATAAACTGAGAAGTGGAATCTTCTGTGTCTCCTCCTGTGCAGGGTGGCTGTGAACAAGTCATATCT
 CCGCCG
[gi|13652846|ref|XM_009000.3|](#) Homo sapiens kallikrein 5 (KLK5), mRNA

Identities = 183/183 (100%), Strand = Plus / Plus

Query: 50 gcttccccacattgggctgaccgtgtctctctagttgaaccctgggaacaatttccaaa 109
 |||
 Sbjct: 1070 gcttccccacattgggctgaccgtgtctctctagttgaaccctgggaacaatttccaaa 1129

Query: 110 actgtccagggcgggggttgctctcaatctccctggggcactttcatcctcaagctcag 169
 |||
 Sbjct: 1130 actgtccagggcgggggttgctctcaatctccctggggcactttcatcctcaagctcag 1189

Query: 170 ggcccatcccttctctgcagctctgacccaaatttagtccagaaataaactgagaagt 229
 |||
 Sbjct: 1190 ggcccatcccttctctgcagctctgacccaaatttagtccagaaataaactgagaagt 1249

Query: 230 gaa 232
 |||
 Sbjct: 1250 gaa 1252

44/1 1.Klon (R) (395 bp) :

AACGAGAAGGGATTGACTGTAATGTGCTATGTACGGTAAATGGCTTTATGTACTATGTACTGTTAAGGGTGGGTAGGTTTGTGGTATCCTAA
 TGGGTGAGGGGTGACTTTGGAGTTGCAGTTGATGTGTGATAGTTGAGGGTTGATTGCTGTACTTGCTTGTAGCATGAGGAGGGGGTTTGTATG
 TGGATTGGGTTTTATGTACTACAGGTGGTCAAGTATTTATGGTACTGTACAATATTCATGGTGGCTGGCAGTAATGTACGAAATACATAGCGG
 TTGTTGATGGGTGAGTCAATACTTGGGTGGTACCCAAATCTGCTTCCCCATGAAAGAACAGAGAATAGTTTAAATTAGAATCTTAGCTTTGGGT
 GCTAATGGTGGAGTAACAA
[gi|13959823|ref|NC_001807.3|](#) Human mitochondrion, complete genome

Identities = 385/389 (98%), Strand = Plus / Minus

Query: 2 acgagaagggatttgactgtaatgtgctatgtacggtaaagtgcctttatgtactatgtac 61
 |||
 Sbjct: 16361 acgagaagggatttgactgtaatgtgctatgtacggtaaagtgcctttatgtactatgtac 16302

Query: 62 tgtaaggggtggtaggtttgttggtatcctaattgggtgaggggtgactttggagttgca 121
 |||
 Sbjct: 16301 tgtaaggggtggtaggtttgttggtatcctaattgggtgaggggtgactttggagttgca 16242

Query: 122 gttgatgtgtgatagttgaggggtgattgctgtacttgcttgaagcatgaggagggggt 181
 |||
 Sbjct: 16241 gttgatgtgtgatagttgaggggtgattgctgtacttgcttgaagcatgaggagggggt 16182

Query: 182 tttgatgtggattgggtttttatgtactacaggtggtcaagtatttatggtagctgtacaa 241
 |||
 Sbjct: 16181 tttgatgtggattgggtttttatgtactacaggtggtcaagtatttatggtagctgtacaa 16122

Query: 242 tattcatggtggctggcagtaatgtacgaaatacatagcgggttggtgatgggtgagtc 301
 |||
 Sbjct: 16121 tattcatggtggctggcagtaatgtacgaaatacatagcgggttggtgatgggtgagtc 16062

Query: 302 tacttggttggtacccaaatctgcttcccatgaaagaacagagaatagtttaaattaga 361
 |||
 Sbjct: 16061 tacttggttggtacccaaatctgcttcccatgaaagaacagagaatagtttaaattaga 16002

Query: 362 atcttagctttgggtgctaattggtggagt 390
 |||
 Sbjct: 16001 atcttagctttgggtgctaattggtggagt 15973

44/1 4.Klon (R) (376 bp) :

TGTTACTCCACTCAAGCACTATAGTTGTAGCAGGAATCTTCTTACTCATCCGCTTCCACCCCTAGCAGAAAAATAGCCCACTAATCCAACTCT
AACACTATGCTTAGGCGCTATCACCACCTCTGTTTCGCAGCAGTCTGCGCCCTTACACAAAATGACATCAAAAAATCGTAGCCTTCTCCACTTCA
AGTCAACTAGGACTCATAATAGTTACAATCGGCATCAACCAACCACCTAGCATTCCTGCACATCTGTACCCACGCTTCTTCAAAGCCATAC
TATTTATGTGCTCCGGGTCCATCATCCACAACCTGTTACAATGTTA

[gi|13273284|gb|AF347015.1|AF347015](#) Homo sapiens mitochondrion, complete genome

Identities = 306/313 (97%), Strand = Plus / Plus

Query: 4 tactccactcaagcactatagttgtagcaggaatcttcttactcatccgcttccaccccc 63
|||||
Sbjct: 13074 tactccactcaagcactatagttgtagcaggaatcttcttactcatccgcttccaccccc 13133

Query: 64 tagcagaaaatagcccactaatccaaactctaacactatgcttaggcgctatcaccactc 123
|||||
Sbjct: 13134 tagcagaaaatagcccactaatccaaactctaacactatgcttaggcgctatcaccactc 13193

Query: 124 tgttcgcagcagctctgcgccttacacaaaatgacatcnnnnnntcgtagccttctcca 183
|||||
Sbjct: 13194 tgttcgcagcagctctgcgccttacacaaaatgacatcaaaaaaatcgtagccttctcca 13253

Query: 184 cttcaagtcaactaggactcataatagttacaatcggcacaaaccaaccacacctagcat 243
|||||
Sbjct: 13254 cttcaagtcaactaggactcataatagttacaatcggcacaaaccaaccacacctagcat 13313

Query: 244 tcctgcacatctgtacccacgccttcttcaaagccataactatttatgtgctccgggtcca 303
|||||
Sbjct: 13314 tcctgcacatctgtacccacgccttcttcaaagccataactatttatgtgctccgggtcca 13373

Query: 304 tcacccacaacct 316
|||||
Sbjct: 13374 tcacccacaacct 13386

44A/1* 1.Klon (R) (496 bp) :

GCAAGCTATTAGGTGACACTATAGAATACTCAAGCTATGCATCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGG
AATTCGCCCTTGTACTCCACCATAGCACCCAAAGCTAAGATTCTAATTTAAACTATTCTCTGTTCTTTTCATGGGGAAGCAGATTTGGGTACA
CCCAAGTATTGACTCACCCATCAACAACCGCTATGTAATTTTCGTACATTACTGCCAGCCACCATGAATATTGTACGGTACCATAAAATACTTGACC
ACCTGTAGTACATAAAAACCCAATCCACATCAAAAACCCCTCCTCATGCTTACAAGCAAGTACAGCAATCAACCCCTCAACTATCACACATCAAC
TGCAACTCCAAAGTCACCCCTCACCCATTAGGATACCAACAAACCTACCCACCCTTAACAGTACATAGTACATAAAGCCATTACCGTACATAG
CACATTACAGTCAAATCCCTTCTCGTT

[gi|13272808|gb|AF346981.1|AF346981](#) Homo sapiens mitochondrion, complete genome

Identities = 385/389 (98%), Gaps = 1/389 (0%), Strand = Plus / Plus

Query: 109 actccaccattagcacccaaagctaagattctaatttaaactattctctgttctttcatg 168
|||||
Sbjct: 15975 actccaccattagcacccaaagctaagattctaatttaaactattctctgttctttcatg 16034

Query: 169 gggaagcagatttgggta-cacccaagtattgactcaccatcaacaaccgctatgtatt 227
|||||
Sbjct: 16035 gggaagcagatttgggtaccacccaagtattgactcaccatcaacaaccgctatgtatt 16094

Query: 228 tcgtacattactgccagccaccatgaatattgtacggtaccataaataacttgaccacctg 287
|||||
Sbjct: 16095 tcgtacattactgccagccaccatgaatattgtacggtaccataaataacttgaccacctg 16154

Query: 288 tagtacataaaaacccaatccacatcaaaaacccctcctcatgcttacaagcaagtacag 347
|||||
Sbjct: 16155 tagtacataaaaacccaatccacatcaaaaacccctcctcatgcttacaagcaagtacag 16214

Query: 348 caatcaaccctcaactatcacacatcaactgcaactccaaagtacccctcaccattag 407
|||||
Sbjct: 16215 caatcaaccctcaactatcacacatcaactgcaactccaaagccaccctcaccattag 16274

Query: 408 gataccaacaaacctacccacccttaacagtagacataaagccatttaccgtaca 467
|||||
Sbjct: 16275 gataccaacaaacctacccacccttaacagtagacataaagccatttaccgtaca 16334

Query: 468 tagcacattacagtcaaatcccttctcgt 496
|||||
Sbjct: 16335 tagcacattacagtcaaatcccttctcgt 16363

44/1B* 4.Klon (R) (323 bp) :

AACCAATATTTAGGAAATGACATCAATATGGGGTTTGTAGATAGTCTCGCTTTGTTGCCAGGCTGGAGTGCGGTGACGCGATCTCGGTGATA
CTGGCAGGAGGCAGCTGAATGCCAGGCAGATGGGGCGGGTTCGGTGAAACCACTCCAAGCCAAAGACAGTTTAAAGCCTGACAGCTGAGCTA
CAAGTTAAATCCTCAGACTAGATGAAGAACTTGCCCTTCTGTTGCCACACTTTCCTCTGATTGATCCCCATCCTTACCTATTTTACACATAC
CTACCCCTTCTTAATTTTATTTTGGAGTGAGTAACAA

[gi|10190557|emb|AL118506.27|HSJ591C20](#) Human DNA sequence from clone RP4-591C20 on chromosome 20 Contains

ESTs, STSs, GSSs and CpG islands. Contains a novel gene for a protein similar to mouse NG26, the TPD52L2 gene for three isoforms of tumor protein D52-like protein 2, a gene for a novel >

Identities = 317/319 (99%), Gaps = 2/319 (0%), Strand = Plus / Minus

```
Query: 1      aaccaaataatttaggaaatgacatcaatatggggttttgagatagtcctcgctttgttgcc 60
            |||
Sbjct: 66740 aaccaaataatttaggaaatgacatcaatatggggttttgagatagtcctcgctttgttgcc 66681

Query: 61      caggctggagtgcggtgacgcgatctcggtgatactggcaggaggcagctgaatgccagg 120
            |||
Sbjct: 66680 caggctggagtgcggtgacgcgatctcggtgatactggcaggaggcagctgaatgccagg 66621

Query: 121     cagatggggcggttcc-ggtgaaacc-acctccaagccaaagacagtttaaagcctgac 178
            |||
Sbjct: 66620 cagatggggcggttcccggtgaaaccacctccaagccaaagacagtttaaagcctgac 66561

Query: 179     agctgagctacaagttaaatcctcagactagatgaagaacttgccttcctgtttgccaca 238
            |||
Sbjct: 66560 agctgagctacaagttaaatcctcagactagatgaagaacttgccttcctgtttgccaca 66501

Query: 239     ctttcctctgattgatccccatccttcacctattttacatacctaccctttcctaatt 298
            |||
Sbjct: 66500 ctttcctctgattgatccccatccttcacctattttacatacctaccctttcctaatt 66441

Query: 299     tttatttttgaggtggagt 317
            |||
Sbjct: 66440 tttatttttgaggtggagt 66422
```

44/2 1.Klon (R) (221 bp):

TACGGGGGTCTTAGCTTTGGCTCTBCTTGCAAGTTATTTCTAGTTAATTCATTATGCAGAAGGTATAGGGGTAGTCCTTGCTATATTATGCTT
GGTTATAATTTTTCATCTTTCCCTTGCGGTACTATATCTATTGCGCCAGGTTTCAATTTCTATCGCCTATACTTTATTTGGGTAAATGGTTTGG
CTAAGGTTGTCTGGTAGTAAGGTGGAGTAACAA

[gi|13273284|gb|AF347015.1|AF347015](#) Homo sapiens mitochondrion, complete genome

Identities = 213/215 (99%), Gaps = 1/215 (0%), Strand = Plus / Minus

```
Query: 3      cgggggtccttagctttggctctbcttgcaa-gttatttctagttaattcattatgcagaa 61
            |||
Sbjct: 1908 cgggggtccttagctttggctctccttgcaaagttatttctagttaattcattatgcagaa 1849

Query: 62      ggtataggggttagtccttgctatattatgcttggttataatttttcatctttcccttgc 121
            |||
Sbjct: 1848 ggtataggggttagtccttgctatattatgcttggttataatttttcatctttcccttgc 1789

Query: 122     ggtactatatctattgcgccaggtttcaatttctatcgccatactttatttgggtaaat 181
            |||
Sbjct: 1788 ggtactatatctattgcgccaggtttcaatttctatcgccatactttatttgggtaaat 1729

Query: 182     ggtttgctaaggttgctctgtagtaaggtggagt 216
            |||
Sbjct: 1728 ggtttgctaaggttgctctgtagtaaggtggagt 1694
```

44/2 3. Klon (R) (222 bp):

AACGGGGGTCTTAGCTTTGGCTCTCCYTGCAAAGTTATTTCTAGTTAATTCATTATGCAGAAGGTATAGGGGTAGTCCTTGCTATATTATGCT
TGGTTATAATTTTTCATCTTTCCCTTGCGGTACTATATCTATTGCGCCAGGTTTCAATTTCTATCGCCTATACTTTATTTGGGTAAATGGTTTGG
GCTAAGGTTGTCTGGTAGTAAGGTGGAGTAACAA

[gi|13273284|gb|AF347015.1|AF347015](#) Homo sapiens mitochondrion, complete genome

Identities = 212/215 (98%), Strand = Plus / Minus

```
Query: 3      cgggggtccttagctttggctctccytgcaaagttatttctagttaattcattatgcagaa 62
            |||
Sbjct: 1908 cgggggtccttagctttggctctccttgcaaagttatttctagttaattcattatgcagaa 1849

Query: 63      ggtataggggttagtccttgctatattatgcttggttataatttttcatctttcccttgc 122
            |||
Sbjct: 1848 ggtataggggttagtccttgctatattatgcttggttataatttttcatctttcccttgc 1789

Query: 123     ggtactatatctattgcgccaggtttcaatttctatcgccatactttatttgggtaaat 182
            |||
Sbjct: 1788 ggtactatatctattgcgccaggtttcaatttctatcgccatactttatttgggtaaat 1729
```


Query: 183 ggtttggttaaggttgctgtagtaaggtggagt 217
 |||||
 Sbjct: 1728 ggtttggttaaggttgctgtagtaaggtggagt 1694

44/2 4.Klon (R) (223 bp) :

AACCATTTACAAATATGTTTAAATAGCAGCATTTCTTTAAAGAAAAACAAAGTTCAAATGCCCAATAATAATTATGTTTAACTTGGTACACAT
 ATAAATAGACAAAAGGCTGCGGAGAACACTGGATTAAATAAAGGTGTTATGGGTATAATTAACATAATTATTTTATGAATAAATAAGAAAA
 AAGTCCCTGGCTATAAAGGATAGTGGAGTAACAA
[gi|13637270|ref|XM_016401.1|](#) Homo sapiens hypothetical protein FLJ23476 (FLJ23476), mRNA

Identities = 214/214 (100%), Strand = Plus / Minus

Query: 3 ccatttacaaatatgtttaatagcagcatttctttaagaaaaacaaagttcaaatgcc 62
 |||||
 Sbjct: 1434 ccatttacaaatatgtttaatagcagcatttctttaagaaaaacaaagttcaaatgcc 1375
 Query: 63 aataataattatgtttaacacttggtacacataataatagacaaaaggctgcgagaaca 122
 |||||
 Sbjct: 1374 aataataattatgtttaacacttggtacacataataatagacaaaaggctgcgagaaca 1315
 Query: 123 ctggatttaaataaagggtgttatgggtataattaactataatttattttatgaataaata 182
 |||||
 Sbjct: 1314 ctggatttaaataaagggtgttatgggtataattaactataatttattttatgaataaata 1255
 Query: 183 agaaaaaagtccttggtataaaggatagtgag 216
 |||||
 Sbjct: 1254 agaaaaaagtccttggtataaaggatagtgag 1221

44/3 1.Klon (R) (138 bp) :

TGTTACTCCACCTAGACTGTAAACCTCTCGAGGGCAGGGACCACACCTGTACTGTTCTGTGCTTTTCACAGCTCCTCCACAATGCTGAATAT
 ACAGCAGGTGCTCAATAATGATTCTTAGTGACTTTACTTGTTA
[gi|12804964|gb|BC001935.1|BC001935](#) Homo sapiens, cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21,
 Cip1), clone MGC:4059, mRNA, complete cds

Identities = 126/126 (100%), Strand = Plus / Plus

Query: 6 ctccacctagactgtaaacctctcgagggcagggaccacacctgtactgttctgtgtct 65
 |||||
 Sbjct: 1982 ctccacctagactgtaaacctctcgagggcagggaccacacctgtactgttctgtgtct 2041
 Query: 66 ttcacagctcctcccacaatgctgaatatacagcaggtgctcaataaatgattcttagtg 125
 |||||
 Sbjct: 2042 ttcacagctcctcccacaatgctgaatatacagcaggtgctcaataaatgattcttagtg 2101
 Query: 126 acttta 131
 |||||
 Sbjct: 2102 acttta 2107

46/4 1.Klon (R) (452 bp) :

CGGCAAAATAATTTTATTTCTTAACATATGGTAACATATACATCCAATATGTGCTCCCTTGACATCTATTACAAAGTGACTTCCAAATGACA
 ACTGCTTTGATATTTAAGCATGTGCTAAAAGTTATCTTAGTTGAGATATGAAAAATGCTTTAGATGGATAACATTCTGAGTATATTGGATTAGT
 CACAGCAGAATTTACTTTAGTTAGATGAGTCTACAAATTTAAAGCTTTGAAAAGCTACTACTTTTACTTCTAATACATCCAGATGAACACGAT
 GTAGCAATATCAGCTTGTATTTCCAGAGAAATCTATTAGTTTCTGGTGATGGAACCACTTATCCACGTCTGTTGGTACTGTGCAGGCAGATT
 CACAGGCGCATCCCACTACTGATCAGCACGGGAGTTTGTACCYGCTCCGTTTCCGACCTGGGCCGGTTACCTAA
[gi|11526786|gb|AF217186.1|AF217186](#) Homo sapiens inorganic pyrophosphatase 1 (PPA1) mRNA,
 complete cds

Identities = 382/382 (100%), Strand = Plus / Minus

Query: 1 cggcaaaaataatTTTATTTCTTAACATATGGTAACATATACATCCAATATGTGCTCCCT 60
 |||||
 Sbjct: 1187 cggcaaaaataatTTTATTTCTTAACATATGGTAACATATACATCCAATATGTGCTCCCT 1128
 Query: 61 tgcacatctattcacaagtgacttccaaatgacaactgctttgatatttaagcatgtgct 120
 |||||
 Sbjct: 1127 tgcacatctattcacaagtgacttccaaatgacaactgctttgatatttaagcatgtgct 1068
 Query: 121 aaaagttatcttagttgagatatgaaaaatgcttttagatggataacattctgagtatatt 180
 |||||
 Sbjct: 1067 aaaagttatcttagttgagatatgaaaaatgcttttagatggataacattctgagtatatt 1008
 Query: 181 ggattagtcacagcagaatttacttttagtttagatgagttctacaaatttaagctttgaa 240
 |||||
 Sbjct: 1007 ggattagtcacagcagaatttacttttagtttagatgagttctacaaatttaagctttgaa 948

Query: 241 aagctactacttttacttctaatacatccagatgaacacgatgtagcaatatcagcttgt 300
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 Sbjct: 947 aagctactacttttacttctaatacatccagatgaacacgatgtagcaatatcagcttgt 888

Query: 301 attccagagaaatctcattagtttttctggtgatggaaccacttatccacgtctgttgg 360
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 Sbjct: 887 attccagagaaatctcattagtttttctggtgatggaaccacttatccacgtctgttgg 828

Query: 361 actgtgcaggcagattcacagg 382
 ||||||||||||||||||||
 Sbjct: 827 actgtgcaggcagattcacagg 806

46/4 4.Klon (R) (184 bp) :

TGACCGCTTGTAGTACATAAAAACCCAATCCACATCAAAACCCCTCCTCATGCTTACAAGCAAGTACAGCAATCAACCCTCAACTATCACACA
 TCAACTGCAACTCCAAAGTCACCCCTCACCCATTAGGATACCAACAAACCTACCCACCCTTAACAGTACATAGTACATAAAGCCATTAC
[gi|5732454|gb|AF079515.1|AF079515](#) Homo sapiens IDL RNA, complete sequence; mitochondrial gene

Identities = 181/181 (100%), Strand = Plus / Plus

Query: 4 ccgcttgtagtagacataaaaacccaatccacatcaaaacccctcctcatgcttacaagca 63
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 Sbjct: 1 ccgcttgtagtagacataaaaacccaatccacatcaaaacccctcctcatgcttacaagca 60

Query: 64 agtacagcaatcaaccctcaactatcacacatcaactgcaactccaaagtcacccctcac 123
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 Sbjct: 61 agtacagcaatcaaccctcaactatcacacatcaactgcaactccaaagtcacccctcac 120

Query: 124 ccattaggataccaacaaacctaccaccccttaacagtacatagtagacataaagccattta 183
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 Sbjct: 121 ccattaggataccaacaaacctaccaccccttaacagtacatagtagacataaagccattta 180

Query: 184 c 184
 |
 Sbjct: 181 c 181

46/5 6.Klon (R) (193 bp) :

TTGACCGCTTGTGAGTGGCAGAAAGTGGCAGCATTAGAACTGCTGCACTCCATGGATACATCCAGCACATGTGCTCTCCTCTAGTGTGTGATTC
 CGGTTTCATTAAAGTCAGATTTTGGATTCCACTCAATGAAGTTTGTAACTGCTAAGTTGTGATGTGAGCACTTAGATCACCGTCCCACTACACAA
 GGGCG
[gi|13699198|dbj|AP003475.2|AP003475](#) Homo sapiens genomic DNA, chromosome 8q23, clone: KB2021C9

Identities = 171/171 (100%), Strand = Plus / Minus

Query: 4 accgcttgtgagtgaggcagaaagtggcagcattagaactgctgcaactccatggatacatcc 63
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 Sbjct: 42385 accgcttgtgagtgaggcagaaagtggcagcattagaactgctgcaactccatggatacatcc 42326

Query: 64 agcacatgtgctctcctctagtggtgtgattccggttcatttaagtcagattttggattcc 123
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 Sbjct: 42325 agcacatgtgctctcctctagtggtgtgattccggttcatttaagtcagattttggattcc 42266

Query: 124 actcaatgaagtttgtaactgctaagttgtgatgtgagcacttagatcacc 174
 ||||||||||||||||||||
 Sbjct: 42265 actcaatgaagtttgtaactgctaagttgtgatgtgagcacttagatcacc 42215

47/2 1.Klon (R) (344 bp) :

ACCAGTCAAATTCATTTTCTTCTGGAAAAGAATAACAAACCAATATTTAGGATGTTTCAGAGACTCAACAAAAACCATTCTAGAAATCACCCAG
 AACAAATGTTTTCTGTGTCGCAAGCCTTTTGTCTTCAAAAGTCACCATCCACCAGCTGAAGATTTTACATGCAGATACCAGATACCTTAACCT
 GTATTCTTTAGTCATCTTTTGGCTTGGAAAGTTTCTCTGTTGTCTTTGCTGAATCCTTCGCTTTACCTCCATTCTTAGGTGCTTTGGAGCTGG
 AAGCAGCCTTCTTGCACTTATCCTTTGCTGTGTTCTGTGAGGKTTCTGTAGTGGAGTAACAA
[gi|13646008|ref|XM_003978.3|](#) Homo sapiens calpastatin (CAST), mRNA

Identities = 337/338 (99%), Strand = Plus / Minus

Query: 1 accagtcaaattcattttctttctggaagaataacaaaccaatatttaggatgttcag 60
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 Sbjct: 1547 accagtcaaattcattttctttctggaagaataacaaaccaatatttaggatgttcag 1488

Query: 61 agactcaacaaaaaccattctagaaatcaccagaacaattgttttctgttgccaaagcc 120
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 Sbjct: 1487 agactcaacaaaaaccattctagaaatcaccagaacaattgttttctgttgccaaagcc 1428

Query: 121 ttttgttcttcaaaagtcacccatccaccagctgaagattttacatgcagataccagatac 180
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 Sbjct: 1427 ttttgttcttcaaaagtcacccatccaccagctgaagattttacatgcagataccagatac 1368

Query: 181 ctttaacttgatatttcttttagtcacatcttttggcttggaagtttctctgtgtgtctttgctg 240
 |||
 Sbjct: 1367 ctttaacttgatatttcttttagtcacatcttttggcttggaagtttctctgtgtgtctttgctg 1308

Query: 241 aatccttcgcgttttacctccattcttaggtgctttggagctggaagcagccttcttgact 300
 |||
 Sbjct: 1307 aatccttcgcgttttacctccattcttaggtgctttggagctggaagcagccttcttgact 1248

Query: 301 tatecttttgctgtgttctgtgaggkttctgtagtggag 338
 |||
 Sbjct: 1247 tatecttttgctgtgttctgtgaggkttctgtagtggag 1210

47/3 2.Klon (R) (286 bp) :

TTGTTACTCCACTGAGATGTTTGGCTGGAGAGAAACATAAATCTTGCTTAGAGACACGTCCAGTCATAGTACCTTCCCTTGAACCTCCTTATGA
 CTTAGACTGTATTGCTCACATGTTTCGTTGCTGACCTTCTCCTTATTATCACCTGCGCTCCTACTACATTCCCTTTTGCTAAATAATAAAAAAT
 AATAATCAATAAAAACTGAGGGAACCCAGAGGCCGTGTGCTGGTTCAGATCCTTGCTATGCTGAGCGCCGGTCCCCTAGGCCACTGTTGTTTCT
 CCGT

[gi|4263742|gb|AC004923.2|AC004923](#) Homo sapiens PAC clone RP5-901A4, complete sequence

Identities = 163/170 (95%), Strand = Plus / Plus

Query: 4 ttactccactgagatgtttggctggagagaaacataaaatcttgccttagagacacgtccag 63
 |||
 Sbjct: 61578 ttactccactgagatgtttggctggagagaaacatcaatctggcttagagacacgtccag 61637

Query: 64 tcatagtaccttcccttgaacttccttatgacttagactgtattgctcacatgttctgtg 123
 |||
 Sbjct: 61638 tcatagtaccttcccttgaacttccttatgacatagattctattgctcacatgttctgtg 61697

Query: 124 ctgaccttctccttattatcacccctgcctcctactacattcctttttgc 173
 |||
 Sbjct: 61698 ctgaccttctccttattatcacccctgcctcctactacattcctttttgc 61747

Identities = 76/81 (93%), Strand = Plus / Plus

Query: 204 ctgaggggaaccagaggcctgtgctggttcagatccttggatgctgagcgccgggtcccc 263
 |||
 Sbjct: 61778 ctgaggggaacttgaggcctgtgcccgttcagatccttggatgctgagcgccgggtcccc 61837

Query: 264 tagggccactgttgtttctcc 284
 |||
 Sbjct: 61838 tagggccactgttgtttctcc 61858

47/3 4.Klon (R) (285 bp) :

GTTACTCCACTCAAGCACTATAGTTGTAGCAGGAATCTTCTTACTCATCCGCTTCCACCCCTAGCAGAAAAATAGCCCACTAATCCAACTCTA
 AACTATGCTTAGGCGCTATCACCCTCTGTTTCGAGCAGTCTGCGCCCTTACACAAAAATGACATCAAAAAATCGTAGCCTTCTCCACTTCAA
 GTCAACTAGGACTCATAATAGTTACAATCGGCATCAACCAACCACACCTAGCATTCCTGCACATCTGTACCCACGCCTTCTTCAAAGCCATACT
 GTA

[gi|13273284|gb|AF347015.1|AF347015](#) Homo sapiens mitochondrion, complete genome

Identities = 273/280 (97%), Strand = Plus / Plus

Query: 3 tactccactcaagcactatagttgtagcaggaatcttcttactcatccgcttccaccccc 62
 |||
 Sbjct: 13074 tactccactcaagcactatagttgtagcaggaatcttcttactcatccgcttccaccccc 13133

Query: 63 tagcagaaaatagccactaatccaaactctaactatgcttaggcgctatcaccactc 122
 |||
 Sbjct: 13134 tagcagaaaatagccactaatccaaactctaactatgcttaggcgctatcaccactc 13193

Query: 123 tgttcgcagcagctctgcgcccttacacaaaatgacatcnnnnnntcgtagccttctcca 182
 |||
 Sbjct: 13194 tgttcgcagcagctctgcgcccttacacaaaatgacatcaaaaaaatcgtagccttctcca 13253

Query: 183 cttcaagtcaactaggactcataatagttacaatcggcataaccaaccacacctagcat 242
 |||
 Sbjct: 13254 cttcaagtcaactaggactcataatagttacaatcggcataaccaaccacacctagcat 13313

Query: 243 tcctgcacatctgtacccacgccttcttcaaagccatact 282
 |||
 Sbjct: 13314 tcctgcacatctgtacccacgccttcttcaaagccatact 13353

47/4 1.Klon (R) (166 bp) :

GTTACTCCACCTTACTACCAGACAACCTTAACCAAACCATTTACCCAATAAAGTATAGGCGATAGAAATTGAAACCTGGCGCAATAGATATAG
 TACCGCAAGGGAAAGATGAAAAATTATAACCAAGCATAATATAGCAAGGACTAACCCTTATACCTTCTGCGT

[gi|13273102|gb|AF347002.1|AF347002](#) Homo sapiens mitochondrion, complete genome

Identities = 161/161 (100%), Strand = Plus / Plus

```
Query: 4      actccaccttactaccagacaaccttaaccaaaccatttacccaaataaagtataggcga 63
            |||
Sbjct: 1696 actccaccttactaccagacaaccttaaccaaaccatttacccaaataaagtataggcga 1755

Query: 64      tagaaattgaaacctggcgcaatagatatagtaccgcaagggaaagatgaaaaattataa 123
            |||
Sbjct: 1756 tagaaattgaaacctggcgcaatagatatagtaccgcaagggaaagatgaaaaattataa 1815

Query: 124     ccaagcataatatagcaaggactaaccctataccttctgc 164
            |||
Sbjct: 1816 ccaagcataatatagcaaggactaaccctataccttctgc 1856
```

47/5 1.Klon (R) (136 bp) :

ACACAAGCACGTGCACCTTTATTGAATGAC
 ACTGTAGACAGGTGTGTGGGAATAAAGTGTGTATCTAGGGGCAGGACCA
 AGGGGGCAGGGGCAACAGCCAGCGTGCAGGGCCAGCATTGCACAGTGGA
 GTAACAAG
[gi|12654158|gb|BC000897.1|BC000897](#) Homo sapiens, interferon induced transmembrane protein 1 (9-27), clone MGC:5195, mRNA, complete cds

Identities = 129/131 (98%), Gaps = 1/131 (0%), Strand = Plus / Minus

```
Query: 2      cacaagcacgtgcactttattgaatgacactgtagacaggtgtgtgggaataaactgctg 61
            |||
Sbjct: 666 cacaagcacgtgcactttattgaatgacactgtagacaggtgtgtgggtataaactgctg 607

Query: 62      tatctaggggcaggaccaagggggcaggggcaacagccc-agcgtgcagggccagcattg 120
            |||
Sbjct: 606 tatctaggggcaggaccaagggggcaggggcaacagcccagcgtgcagggccagcattg 547

Query: 121     cacagtggagt 131
            |||
Sbjct: 546 cacagtggagt 536
```

47/5 4. Klon (R) (138 bp) :

ACGACAGGGTCTGGCTGTCAACCCAGGCTGCAGTGTAGTGGCACGATCTTGCCCTCACTGAAACCTCTGCCTCCCTGGGCTCAAGCAATTTGTCCC
 ACCTCAGCCTCTCAAGTAGTTGAGATCACCGTCCAGTACACAA
[gi|6594176|emb|AL109914.16|HSBA27F12](#) Human DNA sequence from clone RP11-27F12 on chromosome 6p22.3-24., Contains STSs and GSSs, complete sequence [Homo sapiens]

Identities = 84/91 (92%), Gaps = 2/91 (2%), Strand = Plus / Plus

```
Query: 15      ctgtcaccaggctgcagtgtagtggcacgatcttgccctcactgaaacctctgcctccct 74
            |||
Sbjct: 9660 ctgtcaccaggctggagtgtagtggcacgatcttgccctcactgcaacctctgcct-cct 9718

Query: 75      gggctcaagcaatttgtccacctcagcctc 105
            |||
Sbjct: 9719 gggctcaagcaa-ttcttccacctcagcctc 9748
```

48/1 1.Klon (402 bp) :

TACGAGTACTATAGGGNGATTGGGCCTCTAGATGCATGCTCGAGCGGCCGNCAGTGTGATGGATATCATGCAGAATTGNCCTTTTTTTTTTTT
 TTACCAGCTTTGGGGGTTTGATTCCTTWCTTTTTTGTCTAGATTTTATGTATACGGGTTCTTCGAATGTGTGGTAGGGTGGGGGAATCATAT
 AGTMACTCCAGGTTTATGGAGGGTTTTCTACTATTAGGACTTTTTYGNTTTGAAGCGAAGGTTTTCAAATAATGAAAATTATTAATATTACTK
 CTGTTAGAGAAATGAATGAGCCTACAGATGATAGGATGTTTCATGTGGTGTATGAATCGGGGTAGTCCGAGTAACGTCGGGGCATTTTCGGATAG
 GCCGAGAAAGTGTGTGGGTAGAAAAG
[gi|13273284|gb|AF347015.1|AF347015](#) Homo sapiens mitochondrion, complete genome

Identities = 291/307 (94%), Gaps = 1/307 (0%), Strand = Plus / Minus

```
Query: 97      accagctttggggggttygattccttwtctttttgtctagattttatgtatacgggttct 156
            |||
Sbjct: 7481 accagctttggggggttcgattccttctctttttgtctagattttatgtatacgggttct 7422

Query: 157     tcgaatgtgtggtagggtgggggaatc-atatagtmactccaggtttatggagggtttt 215
            |||
Sbjct: 7421 tcgaatgtgtggtagggtgggggcatccatatagtcactccaggtttatggagggttct 7362

Query: 216     tctactattaggacttttygntttgaagcgaaggttttcaaataatgaaaattattaat 275
            |||
Sbjct: 7361 tctactattaggacttttcgcttcgaagcgaaggttttcaaataatgaaaattattaat 7302

Query: 276     attactkctgttagagaaatgaatgagcctacagatgataggatgtttcatgtggtgtat 335
            |||
Sbjct: 7301 attactgctgttagagaaatgaatgagcctacagatgataggatgtttcatgtggtgtat 7242
```

ACCAACGGGAGATGCAGTTTATTACACCAGCAGCCATGGGGGCAGAGGAATACACAGCGTTTACAAAGTTAGCTACCTGTACAGAATGGATT
ACATATGCAAAAATAAAAATCTCAAGACCACAGGCAGCGTGAGCCCCACCCCCACGGGAAACAGCAGTGATTAACTTTAGCAATAAACGAAA
GTTTAACTAAGCTATACTAACCCCGAGGGTGGTCAATTTCGTGCCAGCCACCGCGGTACACGATTAAACCAAGTCAATAGAACCGCGGTAAA
GAGTGTTTTAGATCACCCTGCCGATACAC

[gi|13959823|ref|NC_001807.3|](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuclot/gi|13959823|ref|NC_001807.3|) Human mitochondrion, complete genome

```

Query: 137 agccccacccccacgggaacacgcagtgattaaccttttagcaataaacgaaagtttaact 196
      |||| |
Sbjct: 795 agccacacccccacgggaacacgcagtgattaaccttttagcaataaacgaaagtttaact 854

Query: 197 aagctatactaaccacccaggggttggtcaatttcgtgccagccaccgcggtcacacgattaa 256
      |||| |
Sbjct: 855 aagctatactaaccacccaggggttggtcaatttcgtgccagccaccgcggtcacacgattaa 914

Query: 257 cccaagtcaatagaagccggcgtaaaagagtgttttagatcacc 299
      |||| |
Sbjct: 915 cccaagtcaatagaagccggcgtaaaagagtgttttagatcacc 957

```

GTGTACTGGGACGGTGATCGACCTTGAACCTATATGGTTGTTACATGAACGTGCAGCTTATTGCTTGTCATTAAACATACACTTAACGTTTTAT
ACACTCTCAGGT
keine Homologie

ACGGAAATGAGCATTTTAAATGCAGAAAGAAAACCATGATAATTTACAAATGAATCACTTTCTGGGCCAGAGCCAGGRAGGCCAGGAGCTGTGAGGGTAGAAAG

[gi|7022989|dbj|AK001623.1|AK001623](#) Homo sapiens cDNA FLJ10761 fis, clone NT2RP3004669, weakly similar to ETHANOLAMINE KINASE (EC 2.7.1.82)

```

Query: 2      cggaaatgagcatttttaatgcagaaagaaaacatgataatttacaatgaatcactttc 61
            |||
Sbjct: 2429   cggaaatgagcatttttaatgcagaaagaaaacatgataatttacaatgaatcactttc 2370

Query: 62      tgggccagagccaggraggccc-aggagctgtgagggtagaaaag 104
            |||
Sbjct: 2369   tgggccagagccaggaagggcccaggagctgtgagggtagaaaag 2326

```

TACGGAGTCCGGATAATTACAGCAGACGtGGGCCTYAGGGGAGGGCGGGGATGGAGGcTTAGTAGGAAAGACAAGTYCTGATGTCATACTTAGC
TGGAAGTTGTTTCTCTGTGTGTGGRGTACCAA
[gi|13775293|gb|AC013356.8|AC013356](#) Homo sapiens chromosome 15 clone RP11-64K12 map 15q14,
complete sequence

Query: 3 cggagtcgcgataattcagcagacgtgggcctyaggggaggggcggggatggaggcttag 62
 |||
 Sbjct: 19909 cggagtcgcgataattcagcagacgtgggcctcaggggaggggcggggatggaggcttag 19968
 |||
 Query: 63 taggaaagacaagtyctgatgtcatacttagctggaagtgtttctctgtgtggrgta 122
 |||
 Sbjct: 19969 taggaaagacaagtcctgatgtcatacttagctggaagtgtttctctgtgtggaagta 20028
 |||

ACCAGAAAAGTTTAATTTATTTACAAATTTTAAACAAATTACACAAATTGGACAGGAACATTTTCTCATAGACTCAGTTATAATGCAGCATTTA
AGAGCCCAGGCCTAGGAAGCTCTCTCTTTTCTATGTAGGACAAACATACCCAGCAGCATTTTCAAGTTTTACCAATTTTTCTCTTTGTTC
TCATTTTCATTTAAATATTTGCATTTGATTAATAATATACACACACATTTATTTCCAACTATTTCTCATAGAAAATGCTACTTTCATAGG
GCACTTCAACACATTTTGCCTCAAAGTCAAAATGAATTTGGTAGTGCAGTAGGGGTGAGTCCCAATTTCTTATGAGCTGCAACATTTTAAATTT
AATTCAAGTCTTATGTTTCTTTTCCAAAACATTTCTTCACATAGTGATACCTCAATATTTCTTGTTTATTTTTAAACTATCACTTAAAGTGAAT
ACATAAATGTCGATATTAGCATTAAGTCACTATGCTATGTTGGACTAATATTTATCCGACATTTTATTA
[qi|13435368](#)[ref|NM_024423.1|](#) Homo sapiens desmocollin 3 (DSC3), transcript variant Dsc3b, mRNA

XVII

Query: 1 accagaaaagttaaattttattttacaattttaaacaattacacaaattggacaggaacta 60
 |||
 Sbjct: 3607 accagaaaagttaaattttattttacaattttaaacaattacacaaattggacaggaacta 3548

Query: 61 ttctctcatagactcagttataatgcagcatttaagagcccaggcctaggaagctctctc 120
 |||
 Sbjct: 3547 ttctctcatagactcagttataatgcagcatttaagagcccaggcctaggaagctctctc 3488

Query: 121 ttttttctattgttaggacaaactataacccagcctcatttcaagttttaccattttcct 180
 |||
 Sbjct: 3487 ttttttctattgttaggacaaactataacccagcctcatttcaagttttaccattttcct 3428

Query: 181 ctttgttctcatttcattttaaatattgcattgattaataataataacacacacacatt 240
 |||
 Sbjct: 3427 ctttgttctcatttcattttaaatattgcattgattaataataataacacacacacatt 3368

Query: 241 tatttccaactatattcctatagaaaattgctacttcatagggcacttcaacacattttg 300
 |||
 Sbjct: 3367 tatttccaactatattcctatagaaaattgctacttcatagggcacttcaacacattttg 3308

Query: 301 cctccaaagtcaaataaatttggtagtgagtaggggtgagtcaccaattctttatgagct 360
 |||
 Sbjct: 3307 cctccaaagtcaaataaatttggtagtgagtaggggtgagtcaccaattctttatgagct 3248

Query: 361 gcaacatttttaatttaattcagttctcattgtttcttttccaaaactttcttcacatag 420
 |||
 Sbjct: 3247 gcaacatttttaatttaattcagttctcattgtttcttttccaaaactttcttcacatag 3188

Query: 421 tgatactcaatatttctgtttatttttaactatcacttaaagtgaatacataataat 480
 |||
 Sbjct: 3187 tgatactcaatatttctgtttatttttaactatcacttaaagtgaatacataataat 3128

Query: 481 gtgatattagcataacttagctattgttggtgactaatatttatccagcatatttatta 537
 |||
 Sbjct: 3127 gtgatattagcataacttagctattgttggtgactaatatttatccagcatatttatta 3071

54/1* 3.Klon (U) (419 bp):

ACCCAGAGACAGCGTTTCGCTCGTTGCCAGGCCGTAGCGCAACGGCGCAATCTCGGCTCACTGCAACCTCCGCCTCCAGGTTCAAGCGATTC
 TCCTGCCTAAGCCTTCTGAGTAGCTGGGATTACAGGCACACACCACCACTTGGCTAATTTTCATACTTTTAGTAGAGACAGGGTTTGCCAT
 TTGGCCAGGCTGGTCTCAAACTCCTGACCTCAGGTGATCCTCCCGCTCAGCCTCCCAAAGTGCTGGGATTACAGGCGTGAGCACCGCGCCAG
 CCAATACCACTCTTTACAGGCATAGTTTCAGATATGCTAGTTCCATTCAGATACCGCAGTAAAGCAAATATCACATAAACTGAGTCACACAG
 ATGTGTTGGTCCCGAGTGCATATTAAATCATATTTACACTGT

[gi|7705223|gb|AC010134.4|AC010134](#) Homo sapiens BAC clone RP11-127K18 from 2, complete sequence

Identities = 364/370 (98%), Gaps = 1/370 (0%), Strand = Plus / Minus

Query: 51 atctcgggtcactgcaacctccgcctccagggttaagcgattctcctgcctaagccttc 110
 |||||
 Sbjct: 3697 atctcagctcactgcaacctccgcctccgggttaagcgattctcctgcctcagccttc 3638

Query: 111 tgagtagctgggattacaggcacacaccaccacacttggttaattttcatacttttagta 170
 |||
 Sbjct: 3637 tgagtagctgggattacaggcacacaccaccacacttggttaattttcatacttttagta 3578

Query: 171 gagacaggggttttgccatttgccaggtggtctcaaactcctgacctcaggtgatcctc 230
 |||
 Sbjct: 3577 gagacaggggttttgccatttgccaggtggtctcaaactcctgacctcaggtgatcctc 3518

Query: 231 ccgcctcagcctcccaaagtgcgtgggattacaggcgtgagc-accgcgcccagccaatac 289
 |||
 Sbjct: 3517 ccgcctcagcctcccaaagtgcgtgggattacaggcgtgagccacgcgcccagccaatac 3458

Query: 290 cacccttttacaggcatagttcagatatgctagttccattccagataaccgcagtaaagca 349
 |||
 Sbjct: 3457 cacccttttacaggcatagttcagatatgctagttccattccagataactgcagtaaagca 3398

Query: 350 aatatcacaataaactgagtcacacagatgtgttggttcccagtgcatattaaaatcata 409
 |||
 Sbjct: 3397 aatatcacaataaactgagtcacacagatgtgttggttcccagtgcatattaaaatcata 3338

Query: 410 tttacactgt 419
 |||
 Sbjct: 3337 tttacactgt 3328

54/2* 2.Klon (R) (215 bp) :

ACACAAGGAAAAAGTAGTTAGCATTTAATGAAACTCCCTCCATGTGGCTTCAAGCCACCAGGACACAGGCCCCCAACTCTTAATCTTCTC
 CTCAGCTCTTCTGCTGAAGAATTTGGCCTTCACGATGACAGGCTGCTTTGGGAGCTTTCCCTTTCCAGAACTTTGTAGTAGCCCCGAWCGCACC
 ACATCAATGATGGGAGCAGCCCCCGT
[gi|14141189|ref|NM_000990.2|](#) Homo sapiens ribosomal protein L27a (RPL27A), mRNA

Identities = 194/202 (96%), Strand = Plus / Minus

Query: 10 aaaagtagttagcatttaatgaaactccctccatgtggcttcaagccaccaggacacagg 69
 |||
 Sbjct: 509 aaaagtagttagcatttaatgaaactccctccatgtggcttcaagccaccaggacacagg 450

Query: 70 nnnnnnnaacactcttaatcttctcctcagctcttctgctgaagaatttggccttcacga 129
 |||
 Sbjct: 449 ccccccaacactcttaatcttctcctcagctcttctgctgaagaatttggccttcacga 390

Query: 130 tgacagggtgcttttgggagctttccctttccagaactttgtagtagcccgawcgaccca 189
 |||
 Sbjct: 389 tgacagggtgcttttgggagctttccctttccagaactttgtagtagcccgatcgaccca 330

Query: 190 catcaatgatgggagcagcccc 211
 |||
 Sbjct: 329 catcaatgatgggagcagcccc 308

54/2* 5.Klon (R) (230 bp) :

TTGTGTACTGGGACGGTGATCTGCTGTATGTTACAGTTATGTAATTGACTTGTTTCAAAATATTAAAGTTTAAAGTGTATGCATTCTACTGG
 TCAATAAGTAAATATATTACAGGCTCTGAATGTAGACAGATAAATATATAAATATAGAAAGTACATTTGTTAGAATACAAACAAGAATAAAAAATT
 GAGTACAGAAATGAAACCTTATTAAATTTTATCACTCCGT
[gi|11415221|gb|AC016751.7|AC016751](#) Homo sapiens BAC clone RP11-504020 from 2, complete
 sequence

Identities = 212/212 (100%), Strand = Plus / Plus

Query: 15 ggtgatctgctgtatgttacagttatgtaatttgacttgtttcaaaattattaaagt 74
 |||
 Sbjct: 62555 ggtgatctgctgtatgttacagttatgtaatttgacttgtttcaaaattattaaagt 62614

Query: 75 aagtgtatgcattctactgggtcaataagtaaatatattcaggctctgaatgtagacagat 134
 |||
 Sbjct: 62615 aagtgtatgcattctactgggtcaataagtaaatatattcaggctctgaatgtagacagat 62674

Query: 135 aaatatataaatatagaaagtacatttggtagaatacaaaacaagaataaaaattgagtac 194
 |||
 Sbjct: 62675 aaatatataaatatagaaagtacatttggtagaatacaaaacaagaataaaaattgagtac 62734

Query: 195 agaatgaaaaccttattaaattttatcactcc 226
 |||
 Sbjct: 62735 agaatgaaaaccttattaaattttatcactcc 62766

54/3* 3.Klon (R) (174 bp) :

ACCAAATAAAGCAAAGTCAAACCATCATCTGGAAACAGTGGCCACTTTTCACTGACCTYTYTTCGACATCTAGTCAACCCACCCAATGTGCCAC
 TGGGCTTTCGCTCCCAATTCACCCACCCCTCCATTACAGAGCTCACCACGGCCTCTAGATCACCGTCCCAGTACACAA
[gi|414809|gb|L20815.1|HUMSPROT](#) Human S protein mRNA, complete cds

Identities = 160/165 (96%), Gaps = 1/165 (0%), Strand = Plus / Plus

Query: 1 accaaataaagcaaagtcacacccatcatctggaacagtgccacttttctactgacctyt 60
 |||
 Sbjct: 2016 accaaataaagcaaagtcacacccatcatctggaacagtgccacttttctactgacctct 2075

Query: 61 yttcgacatctagtcaacccacccaatgtgccactgggctttcgtcccaattccacccc 120
 |||
 Sbjct: 2076 cttcgacatctagtcaacccacccaatgtgccactggg-tttcgtcccaattccacccc 2134

Query: 121 accctccattacagagctcaccacggcctcctagatcacccgtccc 165
 |||
 Sbjct: 2135 accctccattacagagctcaccacggcctcctagatcacccgtccc 2179

54/3* 9.Klon (R) (171 bp) :

ACCATAACAGAAACTAGGTTGTTCTTCTCAGTGCAGTGTCCACAGTGTCTCTCGAGCCCTTTCTGGGTCTTAATTGAAAGGTCAGCACTCA
 TCATCCAGCAAGTATAGTTTGTAATATCTAGTGTCCCTAGATGGATCACCCTAAATGGATCACCGTCCCAGTACAC
[gi|8248740|emb|AL133500.3|HSP12](#) Homo sapiens chromosome X sequence from BAC CEPHB328P12 map
 Xq13 region, PHKA1-DXS227, complete sequence

Identities = 159/159 (100%), Strand = Plus / Minus

```

Query: 1      accataacagaaaactagggtgttctcttcagtgcactgtccacagtgtctcctcgagcc 60
             |||
Sbjct: 176748 accataacagaaaactagggtgttctcttcagtgcactgtccacagtgtctcctcgagcc 176689

Query: 61      ctttcctgggtcttaattgaaaggtcagcactcatcatccagcaagtatagtttgtaata 120
             |||
Sbjct: 176688 ctttcctgggtcttaattgaaaggtcagcactcatcatccagcaagtatagtttgtaata 176629

Query: 121     tctagtgtccctagatggatcaccctaaatggatcacc 159
             |||
Sbjct: 176628 tctagtgtccctagatggatcaccctaaatggatcacc 176590

```

55/3 1.Klon (R) (105 bp):

ACAGCACAAGTCACCACTTTATTCTAAGAGAAAACCTGCATTTTCACACACATGGACTCAGGGGTTTCGAACACACGGTTTGTACATCTGCCC
GCTTAGGTAAA

[gi|5763714|emb|AL033518.14|HS322I12](#) Human DNA sequence from clone RP3-322I12 on chromosome
6p21.1-21.31. Contains part of the gene for a novel protein similar to C.elegans C05C8.6
(Tr:016313), STSs and GSSs, complete sequence [Homo sapiens]

Identities = 102/102 (100%), Strand = Plus / Minus

```

Query: 1      acagcacaagtcaccactttatttctaagagaaaacctgcattttcacacacatggactc 60
             |||
Sbjct: 100973 acagcacaagtcaccactttatttctaagagaaaacctgcattttcacacacatggactc 100914

Query: 61      aggggtttcgaacacacggtttgtacatctgcccgttaggt 102
             |||
Sbjct: 100913 aggggtttcgaacacacggtttgtacatctgcccgttaggt 100872

```


6.2 Tabellen und Abbildungen

Tab. 6/1 Ermittelte Expressionsmuster für die DD-Klone in den Untersuchungen mit allen unabhängigen Infektionen

(Buchstabencode siehe Tab. 3/3 und 3/6), (*) = nicht durchgeführt, (n.a.) = nicht auswertbar

Nr.	Klon	DD		DD		RNB	NB	NB	NB	NB
		1.Inf.	3.Inf.	4.Inf.	5. Inf.	4.Inf.	4. Inf.	5. Inf.	6. Inf.	7. Inf.
1	C2 1.K.	*	*	L	L	I	C	*	C	A
2	N1 1.K.	*	C	C	P	Q	*	*	H	P
3	Q1 1.K.	*	*	P	L	H	*	*	*	*
4	Q1 2.K.	*	*	P	L	I	*	*	E	M
5	Q6 1.K.	*	*	P	B	I	*	*	*	*
6	Q6* 1.K.	*	*	P	B	I	*	*	P	P
7	S1 5.K.	*	*	C	B	I	*	*	H	H
8	S1 10.K.	*	*	C	B	Q	*	*	U	U
9	S2 1.K.	*	*	B	B	F	*	*	C	A
10	S3 1.K.	*	*	B	B	Y	*	*	H	H
11	T1 3.K.	*	*	I	I	I	*	*	*	*
12	U5 6.K.	*	*	C	A	K	C	*	H	H
13	12/3 1.K.	I	I	*	*	I	*	*	*	*
14	22/1 4.K.	I	L	*	*	C	*	*	E	K
15	22/3 1.K.	I	I	*	*	I	*	*	*	*
16	23/1 3.Klon	I	I	*	*	I	C	*	P	P
17	24A/1 10. K.	C	C	*	*	C	*	*	F	B
18	24B/1 1.K.	C	C	*	*	I	U	*	X	P
19	33/1 4.K.	C	C	*	*	I	*	*	*	*

20	33/5 1.K.	C	C	*	*	V	C	*	B	A
21	33/6 1.K.	C	C	*	*	V	*	*	*	*
22	36/1 3.K.	C	D	*	*	I	*	*	*	*
23	36/1 4.K.	C	D	*	*	C	*	*	*	*
24	36/3 2.K.	C	E	*	*	Q	*	*	*	*
25	44/1 1.K.	I	M	*	*	I	*	*	*	*
26	44/1 4.K.	I	M	*	*	U	*	*	*	*
27	44A/1* 1.K.	I	M	*	*	E	*	*	H	n.a.
28	44B/1* 4.K.	I	M	*	*	U	*	*	*	*
29	44/2 1.K.	C	M	*	*	U	*	*	*	*
30	44/2 3.K.	C	M	*	*	U	*	*	*	*
31	44/2* 4.K.	C	M	*	*	I	*	*	B	K
32	44/3 1.K.	E	E	*	*	W	*	*	*	*
33	46/4 1.K.	C	C	*	*	I	*	*	*	*
34	46/4 4.K.	C	C	*	*	S	*	*	H	H
35	46/5 6.K.	C	C	*	*	A	*	*	*	K
36	47/2 1.K.	E	E	*	*	I	*	*	*	L
37	47/3 2.K.	E	E	*	*	Q	*	*	*	P
38	47/3 4.K.	E	E	*	*	U	*	*	H	H
39	47/4 1.Klon	C	C	*	*	Y	*	*	*	*
40	47/5 1.K.	C	C	*	*	U	*	*	*	*
41	47/5 4.K.	C	C	*	*	S	*	*	*	*

42	48/1 1.K.	C	G	*	*	U	*	*	H	H
43	48/1 7.K.	C	G	*	*	U	*	*	*	*
44	48/2 4.K.	G	G	*	*	I	*	*	*	*
45	48/2* 4.K.	G	G	*	*	T	*	*	*	*
46	53/3 1.K.	C	C	*	*	I	*	*	*	H
47	54/1* 2.K.	C	C	*	*	B	*	*	F	P
48	54/1* 3.K.	C	C	*	*	T	*	*	*	*
49	54/2* 2.K.	C	E	*	*	I	*	*	C	P
50	54/2* 5.K.	C	E	*	*	I	*	*	*	K
51	54/3* 3.K.	C	D	*	*	H	*	*	n.a.	n.a.
52	54/3 9.K.	C	D	*	*	T	*	*	*	H
53	55/3 1.K.	C	C	*	*	T	M	*	*	*

Tab. 6/2 Ergebnisse der Klonheterogenitätsanalyse (nicht alle der 10 gepickten Klone enthielten Inserts)

lfd. Nr.	DD-cDNA	Verteilung von Klonen mit verschiedenen Inserts						Summe der Inserts						Identifizierte Klone (Glyzerinkultur vorhanden)				
		1.Klon	2.Klon	3.Klon	4.Klon	5.Klon	6.Klon	1	2	3	4	5	6					
1	C1	2 v. 2						X						C1 5.K.				
2	C2	4 v. 9	5 v. 9						X					C2 1. K.	C2 2. K.			
3	G3	3 v. 8	1 v. 8	1 v. 8	2 v. 8	1 v. 8						X		G3 1.K.	G3 2.K.	G3 5.K.	G3 7.K.	G3 9.K.
4	G4	7 v. 9	1 v. 9	1 v. 9						X				G4 2.K.	G4 5.K.	G4 7.K.		
5	G5	8 v. 10	1 v. 10	1 v. 10						X				G5 2.K.	G5 7.K.	G5 8.K.		
6	I3	9 v. 9						X						I3 1.K.				
7	I4	6 v. 7	1 v. 7						X					I4 4.K.	I4 10.K.			
8	N1*	2 v. 6	4 v. 6						X					N1 1.K.	N1 3.K.			
9	N1*	2 v. 6	3 v. 6	1 v. 6						X				N1* 1.K.	N1* 3.K.	N1* 4.K.		
10	Q1	2 v. 9	6 v. 9	1 v. 9						X				Q1 1.K.	Q1 2.K.	Q1 3.K.		
11	Q2	4 v. 4						X						Q2 1.K.				
12	Q4	1 v. 2	1 v. 2						X					Q4 3.K.	Q4 4.K.			
13	Q5	2 v. 7	5 v. 7						X					Q5 5.K.	Q5 10.K.			
14	Q6	5 v. 5						X						Q6 1.K.				
15	Q6*	4 v. 6	2 v. 6						X					Q6* 1.K.	Q6* 3.K.			
16	Q7*	3 v. 3						X						Q7 3.K.				
17	Q7*	1 v. 4	2 v. 4	1 v. 4						X				Q7* 2.K.	Q7* 4.K.	Q7 5.K.		
18	Q8	8 v. 8						X						Q8 1.K.				
19	S1	8 v. 10	1 v. 10	1 v. 10						X				S1 1.K.	S1 5.K.	S1 10.K.		
20	S2	8 v. 10	2 v. 10						X					S2 1.K.	S2 5.K.			
21	S3	10 v. 10						X						S3 1.K.				
22	T1	2 v. 3	1 v. 3						X					T1 3.K.	T1 5.K.			
23	U5	9 v. 10	1 v. 10						X					U5 6.K.	U5 8.K.			
24	W1	4 v. 4						X						W1 3.K.				
25	W1*	4 v. 5	1 v. 5						X					W1* 2.K.	W1 * 3.K.			
26	W2	6 v. 6						X						W2 1.K.				
27	W3	5 v. 5						X						W3 1.K.				
28	W3*	2 v. 3	1 v. 3						X					W3* 5.K.	W3* 6.K.			
29	W4	3 v. 3						X						W4 2.K.				
30	W5	6 v. 7	1 v. 7						X					W5 1.K.	W5 8.K.			

31	W6*	6 v. 6						X						W6* 1.K.					
32	W6	3 v. 3						X						W6 2.K.					
33	12I3	8 v. 10	2 v. 10						X					12/3 1.K.	12/3 3.K.				
34	21I1	1 v. 3	2 v. 3						X					21/1 1.K.	21/1 2.K.				
35	21I3	2 v. 3	1 v. 3					X						21/3 1.K.	21/3 2.K.				
36	22I3	2 v. 8	2 v. 8	3 v. 8	1 v. 8	1 v. 8						X		22/1 1.K.	22/1 2.K.	22/1 3.K.	22/1 4.K.	22/1 7.K.	
37	22I2	4 v. 4						X						22/2 1.K.					
38	22I3	2 v. 2						X						22/3 1.K.					
39	22I4	5 v. 5						X						22/4 1.K.					
40	22I6	3 v. 3						X						22/6 4.K.					
41	23I1	4 v. 4						X						23/1 1.K.					
42	24AI1	4 v. 9	2 v. 9	3 v. 9	1 v. 9						X			24A/1 1.K.	24A/1 3.K.	24A/1 7.K.	24A/1 10.K.		
43	24BI1	5 v. 8	1 v. 8	1 v. 8	1 v. 8						X			24B/1 1.K.	24B/1 2.K.	24B/1 3.K.	24B/1 4.K.		
44	24BI3	8 v. 10	1 v. 10	1 v. 10							X			24B/3 1.K.	24B/3 3.K.	24B/3 4.K.			
45	27/1 *	7 v. 10	3 v. 10						X					27/1* 1.K.	27/1* 8.K.				
46	27I2*	10 v. 10						X						27/2* 1.K.					
47	26A/2*	9 v. 10	1 v. 10						X					26A/2 1.K.	26A/2 4.K.				
48	28I2	1 v. 7	5 v. 7	1 v. 7							X			28/2 1.K.	28/2 2.K.	28/2 7.K.			
49	30/2	9 v. 9						X						30/2 1.K.					
50	30I3	10 v. 10						X						30/3 1.K.					
51	33I1	8 v. 10	2 v. 10						X					33/1 1.K.	33/1 4.K.				
52	33I2	1 v. 2	1 v. 2						X					33/2 1.K.	33/2 3.K.				
53	33I3	4 v. 4						X						33/3 1.K.					
54	33I4	6 v. 6						X						33/4 1.K.					
55	33I5	6 v. 6						X						33/5 1.K.					
56	33I6	6 v. 6						X						33/6 1.K.					
57	33I7	5 v. 5						X						33/7 1.K.					
58	33I8	5 v. 5						X						33/8 1.K.					
59	36/1*	3 v. 6	1 v. 6	1 v. 6	1 v. 6						X			36/1* 1.K.	36/1* 2.K.	36/1* 5.K.	36/1* 6.K.		
60	36I1	3 v. 9	1 v. 9	1 v. 9	3 v. 9	1 v. 9						X		36/1 1.K.	36/1 3.K.	36/1 4.K.	36/1 5.K.	36/1 6.K.	
61	36/2*	6 v. 7	1 v. 7											36/2* 1.K.	36/2* 6.K.				
62	36I2	5 v. 5						X						36/2 1.K.					
63	36/3	7 v. 10	2 v. 10	1 v. 10							X			36/3 1.K.	36/3 2.K.	36/3 6.K.			
64	36I3*	6 v. 8	2 v. 8						X					36/3* 1.K.	36/3* 4.K.				

65	36I1*	4 v. 8	2 v. 8	1 v. 8	1 v. 8					X			36/1* 1.K.	36/1* 2.K.	36/3* 5.K.	36/3* 6.K.		
66	36/2	9 v. 9							X				36/2 1.K.					
67	36I3*	9 v. 10	1 v. 10						X				36/3* 1.K.	36/3* 4.K.				
68	36I4*	4 v. 8	4 v. 8						X				36/4* 3.K.	36/4* 4.K.				
69	44I3	9 v. 10	1 v. 10						X				44/3 1.K.	44/3 5.K.				
70	441IB*	2 v. 5	2 v. 5	1 v. 5						X			441/B* 1.K.	441/B* 4.K.	441/B* 6.K.			
71	44I1	5 v. 9	3 v. 9	1 v. 9						X			44/1 1.K.	44/1 4.K.	44/1 5.K.			
72	441IA*	5 v. 6	1 v. 6							X			441/A* 1.K.	441A/2.K.				
73	44I2	5 v. 10	4 v. 10	1 v. 10						X			44/2 1.K.	44/2 3.K.	44/2 4.K.			
74	44I2*	2 v. 4	2 v. 4								X		44/2* 2.K.	44/2* 4.K.				
75	44/3	3 v. 4	1 v. 4						X				44/3 1.K.	44/3 5.K.				
76	44I3*	3 v. 6	3 v. 6							X			44/3* 1.K.	44/3* 2.K.				
77	44I4	8 v. 8						X					44/4 1.K.					
78	44I4*	6 v. 6						X					44/4* 1.K.					
79	44I5	5 v. 5						X					44/5 1.K.					
80	44I5*	10 v. 10						X					44/5* 1.K.					
81	46I4	4 v. 10	6 v. 10						X				46/4 1.K.	46/4 4.K.				
82	46I5	1 v. 8	1 v. 8	3 v. 8	1 v. 8	1 v. 8	1 v. 8					X	46/5 1.K.	46/5 2.K.	46/5 3.K.	46/5 5.K.	46/5 6.K.	46/5 10.K.
83	47I1	6 v. 6						X					47/1 1.K.					
84	47I2	6 v. 6						X					47/2 2.K.					
85	47I3	1 v. 6	2 v. 6	1 v. 6	1 v. 6	1 v. 6					X		47/3 1.K.	47/2 2.K.	47/2 3.K.	47/2 4.K.	47/2 6.K.	
86	47I4	6 v. 6						X					47/4 1.K.					
87	47I5	3 v. 6	1 v. 6	1 v. 6	1 v. 6					X			47/5 1.K.	47/5 2.K.	47/5 3.K.	47/5 4.K.		
88	47I6	4 v. 6	1 v. 6	1 v. 6					X				47/6 1.K.	47/6 4.K.	47/6 6.K.			
89	48I1	7 v. 10	1 v. 10	1 v. 10	1 v. 10					X			48/1 1.K.	48/1 2.K.	48/1 7.K.	48/1 9.K.		
90	48I2	1 v. 3	2 v. 3							X			48/2 1.K.	48/2 4.K.				
91	48I2*	6 v. 6								X			48/2* 4.K.					
92	53I3	7 v. 7						X					53/3 1.K.					
93	54I1*	3 v. 5	1 v. 5	1 v. 5						X			54/1* 2.K.	54/1* 3.K.	54/1* 9.K.			
94	54I2*	3 v. 9	4 v. 9	1 v. 9	1 v. 9					X			54/2* 1.K.	54/2* 2.K.	54/2* 5.K.	54/2* 6.K.		
95	54I3*	4 v. 7	3 v. 7						X				54/3* 3.K.	54/3* 9.K.				
96	54I4*	5 v. 6	1 v. 6						X				54/4* 3.K.					
97	54I5*	9 v. 9						X					54/5* 1.K.					
98	55I3	10 v. 10						X					55/3 1.K.					
								39	30	14	9	5	1					

Tab. 6/3 Ermittelte Expressionsmuster für die ATLASTM-cDNAs in den Untersuchungen mit allen unabhängigen Infektionen

(Buchstabencode siehe Tab. 3/3 und 3/6), (*) = nicht durchgeführt, (n.a.) = nicht auswertbar

Nr.	Klon	Array		RNB	NB	NB	NB	NB
		4.Inf.	5. Inf.	4.Inf.	4. Inf.	5. Inf.	6. Inf.	7. Inf.
1	A07d 1.K.	B	U	n.a.	T	*	E	M
2	A09l 1.K.	I	I	I	I	*	E	X
3	A14a 1.K.	V	R	n.a.	*	Q	H	H
4	B07l 1.K.	W	I	I	I	*	H	n.a.
5	B08h 1.K.	W	I	n.a.	*	T	E	A
6	B11j 1.K.	Q	R	n.a.	*	*	U	P
7	C13k 1.K.	n.a.	R	n.a.	*	Q	S	Q
8	F09h 1.K.	K	I	n.a.	*	*	F	P
9	F12f 1.K.	K	I	R	R	*	U	U

Tab. 6/4 Zusammenstellung der Expressionsmuster für die angewendeten molekularbiologischen Methoden zur Untersuchung der Genexpression für die ATLAS™-Klone. Angegeben sind die bei der optischen Auswertung beobachteten Expressionsmuster. Da nur LXSN, LXSN+FCS/Ca²⁺ und HPV16E6 verglichen worden sind, sind theoretisch zwei Expressionsmuster möglich. Da die Expressionsstärke von HPV16E6+FCS/Ca²⁺ unbekannt war, weiterhin sind die Ergebnisse der densitometrischen Auswertung und der Northern-Blot-Hybridisierungen in der Tab. aufgeführt sowie deren Vergleich mit der optischen Auswertung
(Buchstabencode siehe Tab. 3/3 und 3/6), (*) = nicht durchgeführt

	Optische Auswertung ATLAS™-cDNA-Arrays				Densitometrische Auswertung ATLAS™- cDNA-Arrays		Ergebnisse Northern-Blot	
	4. und 5. Infektion				4. Infektion	5. Infektion	4. Infektion	5. Infektion
	Beobachtung:			mgl. Muster				
A07d	LXSN	LXSN +FCS	HPV16 E6	B,F	B (B/B=100%, B/F=75%)	U (U/B=50%, U/F=50%)	T (T/B=50%, T/F=75%, T/V=75%)	*
	-	-	↑					
A09l	LXSN	LXSN +FCS	HPV16 E6	H,M	I (I/H=75%, I/M=50%)	I (I/H=75%, I/M=50%)	I (I/H=75%, I/M=50%)	*
	-	-	↓					
A14a	LXSN	LXSN +FCS	HPV16 E6	H,M	V (V/H=25%, V/M=25%)	R (R/H=75%, R/M=50%)	*	Q (Q/H=50%, Q/M=50%)
	-	-	↓					
B07l	LXSN	LXSN +FCS	HPV16 E6	I,K,W	W (W/I=75%, W/K=75%)	I (I/K=75%, I/W=75%)	I (I/K=75%, I/W=75%)	*
	-	↓	↓					
B08h	LXSN	LXSN +FCS	HPV16 E6	I,K,W	W (W/I=75%, W/K=75%)	I (I/K=75%, I/W=75%)	*	T (T/I=50%, T/K=75%, T/W=50%)
	-	↓	↓					
B11j	LXSN	LXSN +FCS	HPV16 E6	Q,R,S,	Q (Q/R=75%, Q/S=75%)	R (R/Q=75%, R/S=75%)	*	*
	-	↑	↓					
C13k	LXSN	LXSN +FCS	HPV16 E6	Q,R,S	*	R (R/Q=75%, R/S=75%)	*	Q (Q/R=75%, Q/S=75%)
	-	↑	↓					
F09h	LXSN	LXSN +FCS	HPV16 E6	H,M	K (K/H=50%, K/M=75%)	I (I/H=75%, I/M=50%)	*	*
	-	-	↓					
F12f	LXSN	LXSN +FCS	HPV16 E6	H,M	K (K/H=50%, K/M=75%)	I (I/H=75%, I/M=50%)	R (R/H=75%, R/M=50%, R/K=50%)	*
	-	-	↓					

Tab. 6/5 Vergleich der gewonnenen Resultate mit den eingesetzten molekularbiologischen Methoden für die Proben LXS_N und HPV16E6 der 4. und 5. Infektion, (*) = nicht durchgeführt, (n.a.) = nicht auswertbar, Bedeutung (↓), (↑), (-) vgl. Tab. 3/1 (Ergebnisteil)

Klon-Nr.	ATLAS TM (densitometrische Auswertung)				Reverser-Northern-Blot		Northern-Blot				Übereinstimmung
	4.Infektion		5.Infektion		4.Infektion		4.Infektion		5.Infektion		
A07d	LXS _N	HPV16E6	LXS _N	HPV16E6	LXS _N	HPV16E6	LXS _N	HPV16E6	LXS _N	HPV16E6	ja
	-	↑	-	↑	n.a.	n.a.	-	↑	*	*	
A09l	LXS _N	HPV16E6	LXS _N	HPV16E6	LXS _N	HPV16E6	LXS _N	HPV16E6	LXS _N	HPV16E6	ja
	-	↓	-	↓	-	↓	-	↓	*	*	
A14a	LXS _N	HPV16E6	LXS _N	HPV16E6	LXS _N	HPV16E6	LXS _N	HPV16E6	LXS _N	HPV16E6	ja
	-	↑	-	↓	n.a.	n.a.	*	*	-	↓	
B07l	LXS _N	HPV16E6	LXS _N	HPV16E6	LXS _N	HPV16E6	LXS _N	HPV16E6	LXS _N	HPV16E6	ja
	-	↓	-	↓	-	↓	-	↓	*	*	
B08h	LXS _N	HPV16E6	LXS _N	HPV16E6	LXS _N	HPV16E6	LXS _N	HPV16E6	LXS _N	HPV16E6	nein
	-	↓	-	↓	n.a.	n.a.	*	*	-	↑	
B11j	LXS _N	HPV16E6	LXS _N	HPV16E6	LXS _N	HPV16E6	LXS _N	HPV16E6	LXS _N	HPV16E6	n.a.
	-	↓	-	↓	n.a.	n.a.	*	*	*	*	
C13k	LXS _N	HPV16E6	LXS _N	HPV16E6	LXS _N	HPV16E6	LXS _N	HPV16E6	LXS _N	HPV16E6	ja
	*	*	-	↓	n.a.	n.a.	*	*	-	↓	
F09h	LXS _N	HPV16E6	LXS _N	HPV16E6	LXS _N	HPV16E6	LXS _N	HPV16E6	LXS _N	HPV16E6	n.a.
	-	↓	-	↓	n.a.	n.a.	*	*	*	*	
F12f	LXS _N	HPV16E6	LXS _N	HPV16E6	LXS _N	HPV16E6	LXS _N	HPV16E6	LXS _N	HPV16E6	ja
	-	↓	-	↓	-	↓	-	↓	*	*	

Tab. 6/6 Ergebnisse der sekundären densitometrischen Auswertung der ATLAS™-Arrays

Gen-Nr.	4. Infektion					5. Infektion				
	Quotienten				Expressions-	Quotienten				Expressions-
	LXSN/	LXSN/	LXSN/	LXSN/	muster	LXSN/	LXSN/	LXSN/	LXSN/	muster
	LXSN/	LXSN+FCS	HPV16E6	HPV16E6+FCS		LXSN	LXSN+FCS	HPV16E6	HPV16E6	
A01 c	1	0,93	0,32	0,63	C	1	2,33	1,27	4,13	I
A03b	1	0,44	0,49	0,29	C	1	0,15	0,64	0,31	C
A10n	1	5,39	3,11	4,5	I	1	1,63	1,34	2,11	I
A13c	1	1,15	0,48	1,07	U	1	1,36	1,32	2,27	I
B02a	1	0,98	0,39	0,35	C	1	2,26	1,33	1,86	I
B04a	1	0,67	0,37	0,36	C	1	1,37	1,46	1,69	I
B04k	1	1,88	0,26	1,06	U	1	2,18	0,92	1,82	U
B12m	1	0,34	0,45	0,23	C	1	0,6	1,28	0,87	Q
B13d	1	2,13	0,24	1,11	U	1	3,98	1,5	5,92	I
C04k	1	1,98	0,36	1,4	U	1	7,27	1,26	5,26	I
D03n	1	0,82	0,8	0,38	C	1	2,56	2,03	2,23	I
E09b	1	13,5	0,48	14,9	U	1	6,99	0,98	6,77	U
G29	1	0,43	0,48	0,46	C	1	1,06	0,97	1,08	U

Identifizierung und Verifizierung differentiell exprimierter Gene- „Differential Display of mRNA“

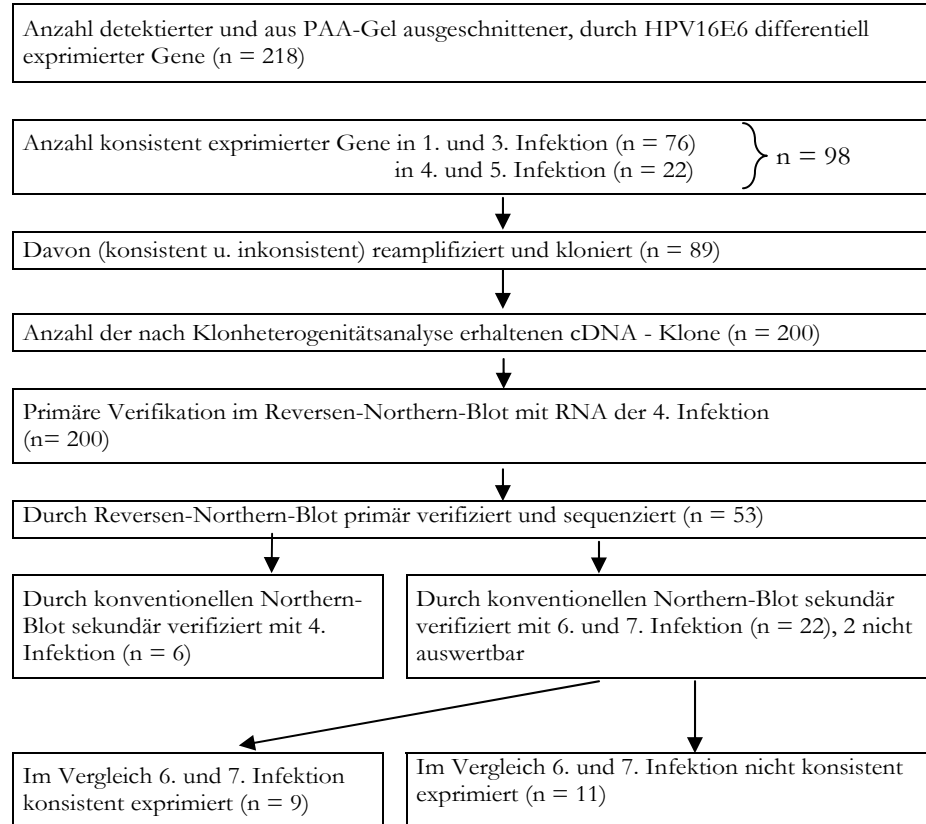


Abb. 6/1

Identifizierung und Verifizierung differentiell exprimierter Gene - ATLAS™-cDNA-Array „Human Cancer 1.2“

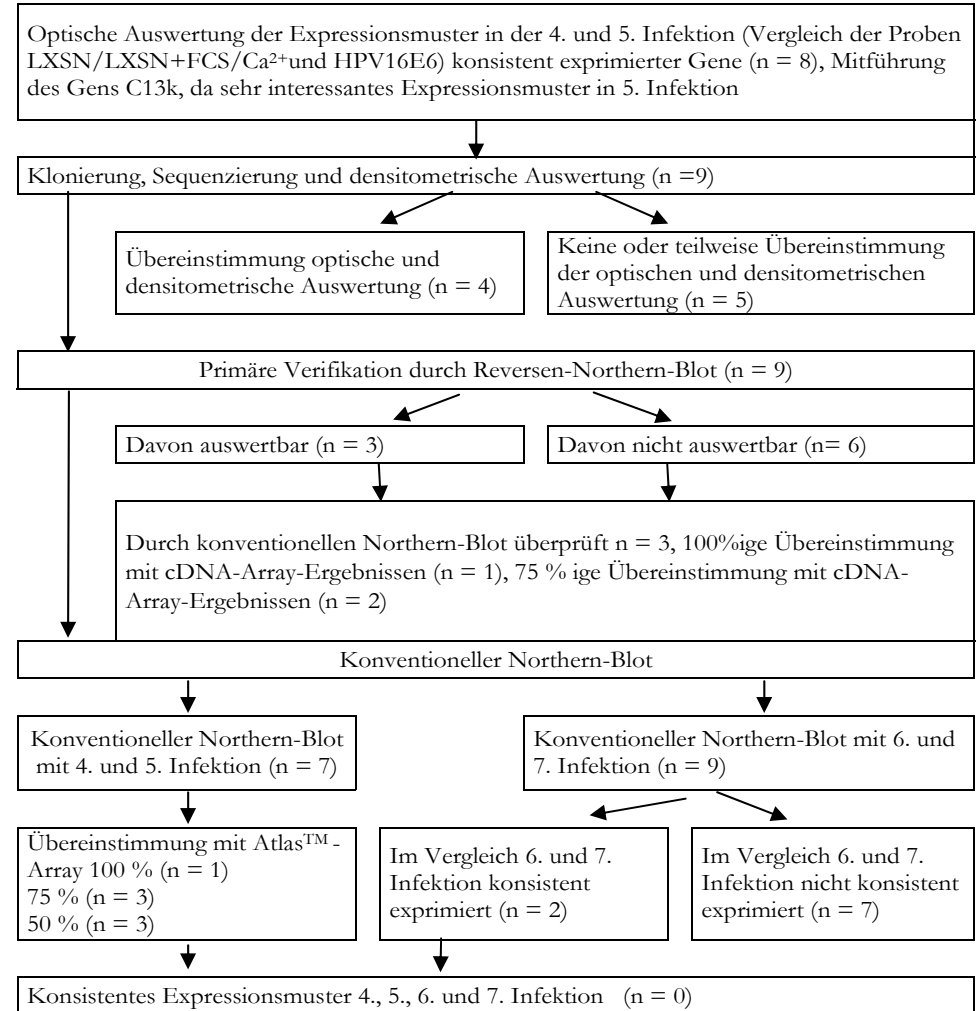


Abb. 6/2

6.3 Lebenslauf

Uta Schurig

geboren am 30.7.1971 in Torgau

1978 - 1988	Zehnklassige Allgemeinbildende Polytechnische Oberschule Torgau
1988 - 1990	Erweiterte Oberschule Torgau
1990	Abitur
1990 - 1992	Beginn des Grundstudiums an der Friedrich-Schiller-Universität Jena, Fachrichtung Biologie (Diplom)
1992	Vordiplom (Stipendium der Deutschen Studienstiftung von 1993 – 1997)
1992 - 1994	Beginn des Hauptstudiums, Hauptfach: Mikrobiologie, Nebenfächer: Biochemie/Molekularbiologie, Zoologie, Ökologie
1994 - 1995	Auslandsaufenthalt innerhalb des Erasmus-Programmes am University College of North Wales Bangor - Department Biology für 4 Monate
1995 - 1996	Fortsetzung des Hauptstudiums an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
1996 - 1997	Diplomarbeit, Thema: „Expressionsanalysen an einem Schlüsselgen der Pheromonsynthese bei Zygomyceten“ am Institut für Allgemeine Mikrobiologie (Friedrich-Schiller-Universität Jena)
1997	Abschluss als Diplombiologin
1997 - 2001	Promotionsstudium, Thema der Doktorarbeit: „Identifizierung differenzierungsrelevanter Gene, deren Expression durch HPV16E6 beeinflusst wird“
1997 - 2000	Wissenschaftliche Mitarbeiterin der Klinischen Forschergruppe der Frauenklinik (Friedrich-Schiller-Universität Jena, Abteilung Gynäkologische Molekularbiologie)
2001 -	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Pathologie, Abt. Experimentelle Rheumatologie (Friedrich-Schiller-Universität Jena)

6.4 Selbständigkeitserklärung

Ich erkläre, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe.

Jena, Januar 2002

Uta Schurig

6.5 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass mir die Promotionsordnung der Fakultät bekannt ist und dass ich die Dissertation selbst angefertigt sowie alle benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in der Dissertation angegeben habe. Mein Betreuer Prof. Dr. Matthias Dürst hat mich bei der Auswahl und Auswertung sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt.

Ich versichere, dass ich die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen habe und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit stehen.

Ich habe diese Arbeit noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht. Ich habe weder die gleiche Arbeit, noch wesentliche Teile der Arbeit bzw. eine andere Abhandlung bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht.

Jena, den 15. Januar 2002

Uta Schurig

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde zwischen dem 15. September 1997 und dem 15. Januar 2001 in der klinischen Forschergruppe der Frauenklinik des Universitätsklinikums Jena angefertigt (Abteilung „Gynäkologische Molekularbiologie“, Leiter: Prof. Dr. Matthias Dürst).

Herrn Prof. Dr. Matthias Dürst danke ich für die Überlassung des Doktorarbeitsthemas, für seine praktische und theoretische Unterstützung während der Durchführung des praktischen Teils der Doktorarbeit sowie für seine sehr gute Unterstützung während der Erstellung des Manuskripts der Dissertation.

Herrn Prof. Dr. Frank Große (IMB, Jena) danke ich vielmals für die Bereitschaft, als Gutachter für die vorliegende Arbeit zur Verfügung zu stehen, sowie für die Betreuung seitens der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der FSU Jena.

Herrn Prof. Dr. Lutz Gissmann (DKFZ, Heidelberg) möchte ich ebenfalls für die Begutachtung meiner Dissertation danken.

Herrn Dr. Noel Whitaker (DKFZ, Heidelberg) danke ich herzlich für die Durchführung der ersten fünf Transduktionsexperimente und für die Bereitstellung der extrahierten RNAs aus diesen Experimenten.

Bei Frau Dr. Levana Sherman (Sackler School of Medicine, Tel Aviv, Israel) möchte ich mich herzlichst für die Durchführung der letzten beiden Transduktionsexperimente bedanken. Durch ihre schnelle Hilfe verschaffte sie mir die Möglichkeit, die Verifikationsexperimente mittels Northern-Blot-Hybridisierung am Schluss meiner Arbeit im größeren Rahmen durchführen zu können.

Herrn Prof. Dr. Karl Nissler (FSU, Jena) danke ich für die Möglichkeit, am Phosphorimager zu arbeiten, sowie für die sehr gute Einführung an diesem Gerät.

Frau Karin Teller danke ich für die sehr gute technische Unterstützung bei den Sequenzierungen der „Differential Display of mRNA“-cDNA-Klone.

Ich danke allen Mitgliedern der klinischen Forschergruppe, die mich während der Durchführung der vorliegenden Arbeit unterstützten. Besonderer Dank gilt Herrn Dipl.-Chemiker Dr. Bernhard Müller, Frau Labor-Ing. Christiane Greinke, Frau Karin Teller, Frau Dipl.-Biol. Marion Nonn sowie Herrn Dipl.-Biol. und Arzt Knuth Rindfleisch.